

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS NA MEDULA ESPINAL, TRONCO
ENCEFÁLICO E NEOCÓRTEX DE RATOS EM UMA SITUAÇÃO DE DOR
NEUROPÁTICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CRISTINA SANTIN BILIBIO GOECKS

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS NA MEDULA ESPINAL, TRONCO
ENCEFÁLICO E NEOCÓRTEX DE RATOS EM UMA SITUAÇÃO DE DOR
NEUROPÁTICA**

CRISTINA SANTIN BILIBIO GOECKS

ORIENTADORA: PROF. Dra. WANIA APARECIDA PARTATA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
FISILOGIA - DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL COMO REQUISITO PARCIAL PARA
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
FISILOGIA

PORTO ALEGRE

2011

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Wania Aparecida Partata, por todo o conhecimento técnico e científico que com toda a calma e paciência me ensinou. Faltam-me as palavras, neste momento, pelo tanto de coisas que teria de agradecer, pois foi muito mais que minha orientadora, foi meu exemplo, minha motivadora, minha mestra nas diversas vezes em que o cansaço das longas horas de viagens, após muitas horas trabalhadas, me fez fraquejar. Obrigado pelo grande senso ético e de profissionalismo que tem em tudo o que faz e pelos exemplos de uma grande mulher que quero levar e seguir durante a minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Comparada, Raphaela, Malcon, Baby, Marcia pelo companheirismo e pelas muitas risadas. Em especial a Andréia Horst, Carolina Kolberg e Taína Sheid por todas as dicas, pelas muitas horas de laboratório, pela grande ajuda no desenvolvimento dos experimentos. Muito obrigado por serem pessoas especiais e terem participado da minha história.

À Coordenadora do PPG Fisiologia, Prof. Dra. Ilma Brum e demais professores do colegiado, por acreditarem que eu conseguiria chegar a este dia. Foram todos, sem dúvida, fundamentais para a minha formação.

À Prof. Dra. Adriane Belló-Klein, por disponibilizar o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para a realização de diversas técnicas.

Às secretárias do PPG Fisiologia, Alice e Silvia, pelas muitas vezes que fizeram todo o possível para que este dia chegasse.

Ao meu esposo, Eduardo Miranda Goecks, pela paciência das muitas horas e muitos finais de semana em que precisava estar estudando.

Ao meu pai, Sergio Luiz Bilibio, obrigado por sempre acreditar em mim. E a todos da família e grandes amigos que torceram por mim em todos os momentos.

A todos o meu sincero muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	14
MATERIAL E METODOS.....	16
1. Animais: Procedência e Manutenção	16
2. Procedimentos experimentais	16
3. Construção do nervo isquiático	18
4. Teste de Von Frey.....	19
5. Teste da Placa Quente.....	21
6. Remoção do tecido nervoso e preparação das amostras	22
7. Quantificação das proteínas.....	22
8. Atividade da enzima Superóxido Dismutase	23
9. Atividade da enzima Catalase	24
10. Quantificação do ácido ascórbico	25
11. Técnica do Xilenol Laranja para determinação da peroxidação lipídica.....	25
12. Análise estatística	27
RESULTADOS	28
1. Teste de Von Frey.....	28
2. Teste da Placa Quente.....	30

3. Atividade da enzima Superóxido Dismutase	31
4. Atividade da enzima Catalase	33
5. Quantificação do ácido ascórbico	35
6. Técnica do Xilenol Laranja para determinação da peroxidação lipídica.....	37
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABS – Absorbância
- ANOVA – Análise de variância
- BHT – 2,6-di ter butil 4-metilfenol
- CAT – Catalase
- CEP – Comitê de ética em pesquisa
- CI – Construção do nervo isquiático
- DNHP – 2,3-dinitrofenilhidrazina
- DRG – Gânglio da raiz dorsal
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona na forma reduzida
- GSSG – Glutaciona na forma oxidada
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- IASP- *International Association for the Study of Pain*
- ME – Medula espinal
- MeOH – Metanol absoluto
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NS – Neurônios de segunda ordem da via nociceptiva
- PAG – Substância cinzenta periaquedutal
- PB – Núcleo parabraquial
- RMV – Bulbo ventral medial rostral
- RT-XO – Reagente de trabalho para a técnica do xilenol laranja
- SNC – Sistema nervoso central
- SOD – Superóxido dismutase
- TPP – Trifenilfosfina
- UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- WDR – Neurônios de amplo espectro de resposta
- XO – Xilenol laranja (o-cresol sulfoneftaleína-3,3'-metilaminodiacético)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Vias nociceptivas da periferia ao SNC.
- Figura 02 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O).
- Figura 03- Estrutura molecular do ácido ascórbico, como ânion monovalente, ascorbato, e sua forma oxidada, o dehidroascorbato, formado a partir da perda de dois elétrons e um próton (Rice, 2000).
- Figura 04 – Esquema de um segmento da medula espinal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal.
- Figura 05 – Aparelho utilizado no teste de Von Frey.
- Figura 06 – Aparelho utilizado no teste da placa quente.
- Figura 07 – Média do número de respostas ao teste de hipersensibilidade mecânica aos filamentos de Von Frey, em gramas (g - eixo da ordenada), aplicados na pata ipsilateral à lesão (direita).
- Figura 08 – Média do número das respostas ao teste de hipersensibilidade mecânica aos filamentos de Von Frey, em gramas (eixo da ordenada), aplicados nas patas ipsilateral e contralateral à lesão.
- Figura 09 – Média da latência (em segundos - s) das respostas ao teste da placa quente.
- Figura 10 – Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) e constrição do nervo isquiático (CI) após 3 e 10 dias da lesão.
- Figura 11 - Medida da atividade da enzima catalase em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) e constrição do nervo isquiático (CI) após 3 e 10 dias da lesão.

Figura 12 - Teores de ácido ascórbico em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) e constrição do nervo isquiático (CI) após 3 e 10 dias da lesão. O

Figura 13 - Medida de lipoperoxidação por método do Xilenol Laranja em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) e constrição do nervo isquiático (CI) após 3 e 10 dias da lesão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Organização dos grupos experimentais

RESUMO

Estudos mostram o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos distintos tipos de dor, porém ainda se desconhece o papel efetivo e as possíveis alterações temporais destas espécies no sistema nervoso central. Um modelo para o estudo da dor neuropática (dor desencadeada por dano em nervo periférico ou agrupamentos neuronais centrais) é a constrição nervosa periférica. Nesta condição um quadro de estresse oxidativo é estabelecido no local da lesão, mas ainda se desconhece as possíveis alterações temporais das EROs no sistema nervoso central. Assim, este estudo demonstrou os efeitos da constrição unilateral do nervo isquiático sobre parâmetros oxidativos, como peroxidação de lipídios, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, e teor do antioxidante não enzimático ácido ascórbico, em medula espinal, tronco encefálico e neocórtex de ratos, considerando nesta avaliação os períodos experimentais de 3 e 10 dias a fim de determinar a variação temporal destes indicadores após a lesão periférica. Para relacionar estes resultados com a sensibilidade dolorosa, foi determinado ainda o efeito da lesão nervosa periférica sobre as sensibilidades mecânica e térmica dos animais.

Para a realização do estudo foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos, pesando 200-300g, os quais foram divididos em 3 grupos experimentais, cada um composto por 06 animais: controle (animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção cirúrgica), *Sham* (animais que sofreram a incisão dos tecidos até a visualização do nervo isquiático; este grupo foi subdividido em dois subgrupos, conforme o tempo entre a cirurgia e a morte do animal, resultando nos subgrupos *Sham* 3 dias e *Sham* 10 dias), e com constrição nervosa (CI) (animais em que o nervo isquiático foi isolado e recebeu em seu tronco comum quatro amarraduras; este grupo foi subdividido em dois subgrupos, conforme o tempo entre a constrição nervosa periférica e a morte do animal, resultando nos subgrupos CI 3 dias e CI 10 dias). Os testes de Von Frey e da placa quente avaliaram as sensibilidades mecânica e térmica, respectivamente, antes da lesão e aos 3 e 10 dias após os procedimentos cirúrgicos. Aos 3 e 10 dias, os animais foram decapitados e retirados medula espinal lombossacral, tronco encefálico e neocórtex, usados para a determinação da peroxidação lipídica (pela técnica do xilenol laranja), atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e teores de ácido ascórbico. Os dados foram analisados por teste *t* de Student para amostras pareadas, na análise dos resultados dos testes de sensibilidade, e ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni, na análise dos dados bioquímicos, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

Aos 3 e 10 dias, as sensibilidades mecânica e térmica estavam aumentadas no grupo CI, estando a hiperssensibilidade mecânica restrita à pata lesionada. Nenhuma mudança significativa ocorreu no grupo *Sham*. Na medula espinal, apesar da atividade da SOD estar reduzida aos 3 dias nos grupos *Sham* e CI, esta diminuição não foi significativa. Porém, aos 10 dias houve aumento significativo na atividade desta enzima em ambos os grupos experimentais. No tronco encefálico, a atividade da SOD estava significativamente reduzida aos 3 dias nos grupos *Sham* e CI. Aos 10 dias, esta atividade ainda se encontrava reduzida no grupo *Sham*, mas com valor similar ao do grupo controle nos ratos CI. No neocórtex, a atividade da SOD foi

significativamente aumentada no grupo CI aos 3 e 10 dias, enquanto no grupo *Sham* o acréscimo ocorreu apenas aos 10 dias. A atividade da CAT aumentou significativamente na medula espinal dos ratos CI aos 3 e 10 dias, não ocorrendo mudanças significativas neste tecido dos ratos *Sham*. No tronco encefálico, a atividade desta enzima diminuiu significativamente no grupo *Sham* aos 10 dias, mas aumentou no grupo CI neste período. Nenhuma mudança estatisticamente significativa foi observada aos 3 dias. No neocórtex, a atividade da CAT aumentou significativamente aos 10 dias apenas no grupo CI. O teor de ácido ascórbico diminuiu significativamente somente aos 3 dias na medula espinal do grupo CI. Nenhuma modificação significativa ocorreu no tronco encefálico e neocórtex. A peroxidação lipídica estava significativamente aumentada na medula espinal dos ratos CI aos 3 e 10 dias, mas apenas aos 10 dias nos ratos *Sham*. No tronco encefálico e no neocórtex, o aumento significativo foi observado apenas aos 10 dias nos grupos *Sham* e CI.

Estes resultados mostram que a constrição do nervo isquiático, bem como a manipulação deste nervo, altera parâmetros oxidativos em regiões do sistema nervoso central, estando estas mudanças possivelmente relacionadas com o diferente nível de ativação das vias nociceptivas centrais nos ratos *Sham* e CI.

INTRODUÇÃO

A medicina, como ciência, surgiu na tentativa de entender e buscar soluções para as diversas condições que afetam o estado de saúde dos seres humanos; e, ao longo de séculos, vem estudando os mecanismos funcionais do corpo humano com o intuito de compreender as alterações que levam a danos nesse sistema. Normalmente um indivíduo procura auxílio médico quando é acometido por uma condição dolorosa. Mas o que é a dor? Diversos conceitos foram propostos em diferentes momentos da história do estudo da dor.

Uma definição propõe que dor é a percepção de sensações tão diversas como a irritação, inflamação, ardência ou latejar, geralmente sensações oriundas de alguma parte do corpo, tratando-se assim de uma experiência desagradável (Millan, 1999; Loeser et al., 2001). Tracey (2005) definiu dor como uma experiência consciente, fruto da interpretação e percepção de um estímulo nocivo, e que sofre a influência de fatores emocionais, cognitivos, mnemônicos e patológicos. Nesta nova definição foram considerados outros fatores que influenciam direta ou indiretamente a forma de percepção de uma sensação dolorosa. À medida que a compreensão sobre os mecanismos de dor foi evoluindo suas definições também foram sendo aprimoradas e, em 2008, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2008) passou a considerar também o caráter multifatorial que compõe esta sensação, e a define como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal dano.

Nocicepção, entretanto, é o processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos, ou seja, se refere aos mecanismos pelos quais a dor é codificada e transmitida ao sistema nervoso central (SNC) (Loeser et al., 2001; Xie et al, 2008; IASP, 2008). Há quase um século foi proposta a existência de nociceptores, que são terminações livres de neurônios nociceptivos periféricos, as quais são ativadas por estímulos de intensidades capazes de causar lesão tecidual (Sneddon, 2004; Mosley et al, 2006). Estudos têm mostrado que os estímulos nocivos desencadeiam alterações celulares que levam à liberação de substâncias químicas, independente dos mesmos serem induzidos por doenças, inflamações, acidentes ou provocados por cirurgias ou quaisquer outros procedimentos (Millan, 1999; Loeser et al., 2001; Xie et al, 2008). Nociceptores também possuem especificidade aos estímulos, os quais podem ser de

diferentes modalidades: térmicos, mecânicos e/ou químicos (Loeser et al., 2001; Millan, 1999).

Os nociceptores são fibras nervosas do tipo A delta (A δ) e C. Em mamíferos, as fibras A δ são pouco mielinizadas, sendo responsáveis pela transmissão da dor primária ou “primeira dor”. As fibras do tipo C, amielínicas, são as responsáveis pela transmissão da dor secundária (Loeser et al., 2001; Millan, 1999; Xie et al, 2008). Nesse sistema, cada neurônio constitui um canal independente de comunicação sensorial, que comunica ao SNC o estímulo que ocorreu na periferia (Siniscalco et al, 2007). Sinais provenientes da pele, dos músculos e das articulações de membros e tronco chegam ao corno dorsal ou posterior da medula espinal, ocorrendo neste local a modulação inicial destas informações.

Para Costigan e colaboradores (2009), a dor pode ser classificada em três tipos, nociceptiva, inflamatória e disfuncional. O autor considera a dor nociceptiva como um sinal de alarme mediado por fibras amielínicas tipo C e finamente mielinizadas tipo A δ . Estas fibras expressam receptores que respondem a estímulos térmicos e mecânicos de forte intensidade, bem como a mediadores químicos endógenos e exógenos. Funcionalmente pode-se dizer que a dor nociceptiva é protetora, ocorrendo sempre em resposta a um estímulo nocivo e perdurando enquanto o estímulo estiver presente. A dor inflamatória, por sua vez, ocorre em resposta a uma lesão, quando a proteção não foi suficiente para evitar o dano. Na tentativa de reparar a lesão, o sistema nervoso promove mudanças na responsividade desse sistema, de forma que estímulos inócuos e nocivos desencadeiam respostas exageradas e prolongadas (Costigan et al, 2009, Juhl et al, 2008). Esta sensibilidade aumentada ocorre nas áreas lesionadas e em áreas adjacentes como resultado da plasticidade dos nociceptores e de vias nociceptivas centrais (Costigan et al, 2009).

As dores disfuncionais são más adaptações uma vez que deveriam proteger o organismo de possíveis estímulos nociceptivos, e resultam de um mau funcionamento no sistema somatossensorial. Ocorrem em situações em que não são identificados o estímulo nocivo específico e o estímulo inflamatório em curso, ou mesmo um dano neuronal.

Uma característica comum aos diferentes tipos de dor é a sensibilização, a qual pode ser periférica e central. Na primeira, os mediadores inflamatórios ativam vias de transdução nos nociceptores, ativando e aumentando a inserção de canais iônicos nas

membranas, reduzindo o limiar de ativação ou aumentando a excitabilidade de fibras nociceptivas. Na segunda condição, coexiste um quadro de facilitação nas vias aferentes em nível de medula espinal, onde se encontram alteradas as atividades de moduladores sinápticos, aminoácidos excitatórios, cinética de canais iônicos, densidade de receptores, e ativação de cascatas de cinases pré e pós-sinápticas. Todas essas alterações geram um quadro onde há redução do limiar de ativação, aumento da responsividade e do campo receptivo de neurônios nociceptivos (Costigan et al, 2009).

O corno dorsal da medula espinal recebe terminações de neurônios nociceptivos primários e projeções descendentes de neurônios localizados em distintas regiões encefálicas (Figura 1). Uma das áreas que envia projeções descendentes para o corno dorsal da medula espinal é a substância cinzenta periaquedutal. Esta região recebe eferências de neurônios do córtex frontal, ínsula, hipotálamo e amígdala. Muitas das projeções descendentes da substância cinzenta periaquedutal vão controlar neurônios localizados no corno dorsal ou posterior da medula espinal. Porém, esta projeção é indireta, pois os axônios descendentes da substância cinzenta periaquedutal que possuem esta função fazem sinapses no bulbo ventral medial rostral, e daí emergem os axônios que finalizam no corno dorsal ou posterior da medula espinal (Costigan, et al 2006). Estas projeções contribuem na modulação da entrada sensorial nociceptiva, caracterizando a medula espinal como importante centro integrador da informação nociceptiva periférica (Oliveira e Silva, 2009; Brooks e Tracey, 2005).

A partir da medula espinal, o estímulo nociceptivo ascende para o encéfalo por meio de diferentes tratos - tratos espinotalâmico lateral e medial, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico e espinohipotálamico (D,Mello e Dickenson, 2008). O trato espinotalâmico lateral (neoespinotalâmico) é característico em animais mamíferos, proeminentemente em primatas, com projeções para regiões talâmicas envolvidas no componente sensorial-discriminativo da dor (Millan 1999). Dentre as regiões de projeções talâmicas mais comuns estão os núcleos talâmicos ventral posterior lateral, ventral posterior medial e ventral posterior, e núcleos posteriores. Verifica-se, então, que estes estímulos sofrerão novas modulações sinápticas em diferentes estruturas do tronco encefálico e, secundariamente, em centros talâmicos e estruturas corticolímbicas.

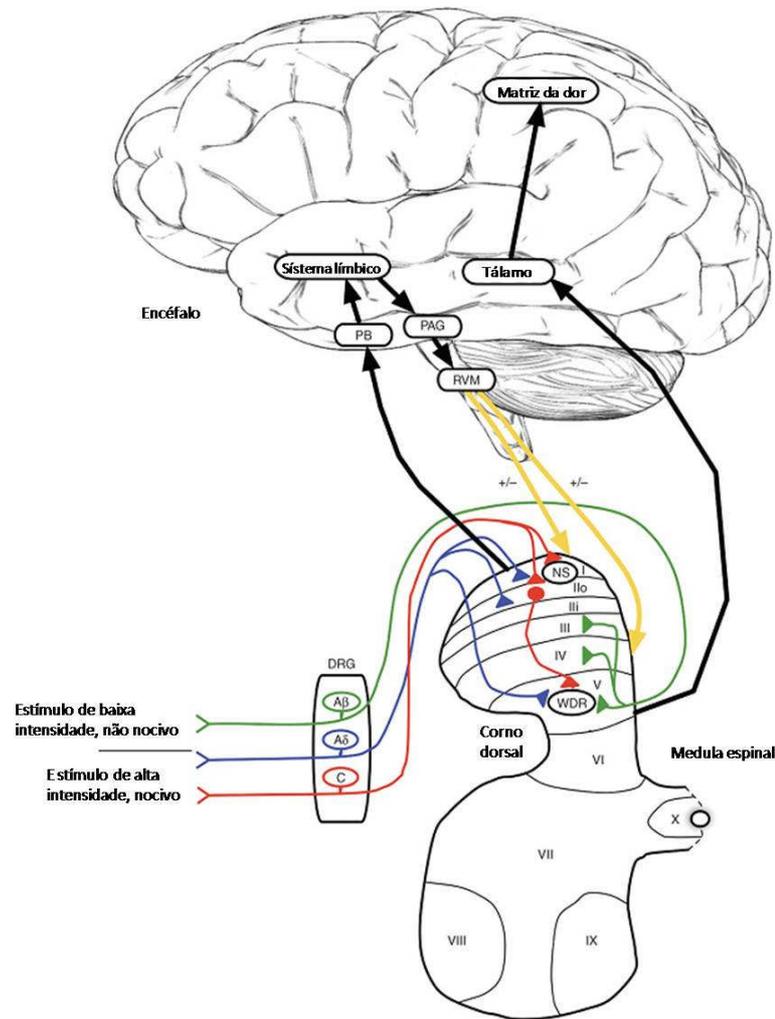


Figura 1. Vias nociceptivas da periferia ao SNC. Fibras aferentes primárias (tipos A β , A δ e C), cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG), transmitem impulsos nervosos da periferia ao corno dorsal da medula espinal. Neurônios de segunda ordem da via nociceptiva (NS) encontram-se principalmente na lâmina superficial do corno dorsal (lâminas I-II), enquanto neurônios de amplo espectro de resposta (WDRs) localizam-se profundamente (lâmina V). Neurônios de projeção da lâmina I inervam regiões como o núcleo parabraquial (PB) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG), as quais se comunicam com o sistema límbico. Deste sistema e da PAG emergem projeções descendentes que se dirigem a núcleos do tronco encefálico, como o bulbo ventral medial rostral (RVM), que modulam o processamento nociceptivo espinal. Neurônios da lâmina V dirigem-se principalmente ao tálamo (trato espinotalâmico), de onde se projetam a várias regiões corticais (córtex somatossensorial primário e secundário, córtices insular, cingulado anterior e pré-frontal) que compõem a “matriz da dor”. Adaptado de D’Mello e Dickenson, 2008.

Dentre os núcleos do tronco encefálico se destacam a formação reticular mesencefálica, o colículo superior, os núcleos cuneiforme e parabraquial, além da substância cinzenta periaquedutal. Estas diferentes regiões de modulação mostram que o tronco apresenta um papel muito importante no processamento da informação nociceptiva, bem como na modulação descendente das respostas, geração de respostas autonômicas e, ainda, envolvimento no componente afetivo-emocional neste tipo de percepção (Millan, 1999).

Todavia, sob certas condições patológicas, como lesão de nervo periférico, constrição nervosa periférica ou dano ao SNC, a dor pode ser produzida por centros mais superiores, independentemente das terminações nervosas nociceptivas periféricas. Neste contexto se enquadra o conceito de dor neuropática, que é a dor originada como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial, em seus elementos periféricos (dor neuropática periférica) ou no SNC (dor neuropática central) (IASP, 2008).

Na clínica médica, a dor neuropática se apresenta como uma dor constante, em queimação, com exacerbação espontânea de tempos em tempos, e com o desenvolvimento de anormalidades sensoriais como disestesia¹, hiperalgesia² e alodinia³, acarretando considerável impacto na qualidade de vida do indivíduo (Teixeira, 2003). Na maioria das vezes, a dor neuropática está associada a lesões que acometem o sistema nervoso periférico. No entanto, pode também ser decorrente de lesão em regiões encefálicas e da medula espinal, embora com menor frequência. Neste caso, está comumente associada a tumores, à epilepsia, a doenças neurodegenerativas, e é denominada de dor neuropática central (Costigan et al., 2009). A dor neuropática pode ainda decorrer de lesões nervosas provocadas por traumas em acidentes automobilísticos e, com menor frequência, de lesões penetrantes por quedas e acidentes industriais (Robinson, 2000). Lacerações por materiais cortantes, por armas de fogo, e fraturas de ossos longos compõem significativa porcentagem das causas de dano traumático aos nervos. O trauma pode gerar lesão por esmagamento, constrição, extensão e ruptura total da fibra nervosa (Campbell, 2009). Os nervos geralmente acometidos são o radial, seguido pelo ulnar e mediano, nos membros superiores, e o nervo isquiático, nos membros inferiores

¹ Disestesia – sensação anormal desagradável, espontânea ou provocada.

² Hiperalgesia – resposta exacerbada frente a um estímulo nocivo.

³ Alodinia – dor frente a um estímulo usualmente inócuo. (Terminologias conforme IASP, 2008).

(Robinson, 2000). Muito do que se conhece a respeito de lesão nervosa periférica deve-se às experiências oriundas das mutilações sofridas pelos soldados e civis durante as grandes guerras ao longo dos últimos séculos – Guerra Civil Americana, Primeira e Segunda Guerras Mundiais, e subsequentes (Robinson, 2000). Quando são observadas as causas de dor neuropática existem também algumas disfunções orgânicas e doenças que podem danificar o tecido nervoso periférico, tais como a neuropatia diabética, a esclerose múltipla, a síndrome do Túnel do Carpo, infecções virais (herpes zoster, vírus da Imunodeficiência Humana – HIV), a deficiência de vitamina B em indivíduos mal nutridos e alcoolistas, e a neurotoxicidade decorrente da terapia com fármacos antineoplásicos e antituberculosos (Zimmermann, 2001).

O interesse pela compreensão dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão deste tipo de dor decorre de sua prevalência na população em geral. Segundo Pasero (2004), a dor neuropática acomete 1,5% da população dos Estados Unidos e 1% daquela do Reino Unido. Este pequeno percentual provavelmente se deve ao fato da dor neuropática se apresentar, em grande parte, com uma série de sintomas adjacentes, o que dificulta o diagnóstico correto da mesma e leva a uma lentidão na entrada destes dados nas estatísticas oficiais.

Para a compreensão dos mecanismos envolvidos na codificação e transmissão da dor, inclusive da neuropática, os mamíferos são os modelos mais empregados. Ainda que não possuam capacidade de comunicação verbal quando em contato com estímulos nocivos, esses animais exibem respostas motoras similares às dos humanos. Tais respostas permitem inferir a existência de dor (Dubner, 1983; Kavaliers, 1988).

Vários modelos são usados para a indução de dor neuropática, dentre os quais podem ser citadas a secção completa e a constrição de um nervo periférico. Várias espécies de animais submetidos a situações que comprovadamente resultam em dor neuropática são utilizadas como modelos para o estudo deste tipo de dor, de seus mecanismos e de sua fisiopatologia (Sommer e Myers, 1995; Zimmermann, 2001; Takeuchi et al, 2007; Xie et al, 2008).

Está demonstrado que a injúria no nervo isquiático ocasiona alterações neuroquímicas e neuroanatômicas importantes em neurônios sensoriais primários, bem como em seus territórios de projeção central (Rydh-Rinder et al., 1996; Ma e Bisby, 1998; Zimmermann, 2001; Mosley et al, 2006). Essas mudanças podem estar envolvidas nos estados anormais de dor subsequentes à lesão nervosa (Ma e Bisby,

1998; Takeuchi et al, 2007). Após a injúria, as principais anormalidades sensoriais observadas são hiperalgesia e alodinia. Essas disfunções podem ser geradas por uma grande variedade de mecanismos, entre eles, mudanças na expressão de canais iônicos localizados em células do gânglio da raiz dorsal e/ou no neuroma, e ainda o fenômeno de comunicação não-sináptica entre neurônios, onde uma célula nervosa modifica a atividade das células adjacentes (Amir e Devor, 1996; Lekan et al., 1996; Millan, 1999; Takeuchi et al, 2007; Xie et al, 2008; Huang e Song, 2008).

Para compreender a fisiopatologia da dor, em especial da neuropática, é preciso entender os mecanismos que promovem o desenvolvimento de transmissão facilitada nas células do gânglio da raiz dorsal, do corno dorsal da medula espinal e de regiões encefálicas. A estimulação repetida das fibras nociceptivas soma-se temporalmente e leva à sensibilização central dos neurônios do corno dorsal, que se manifesta pela redução no limiar de ativação das mesmas. Como resultado, se verifica a elevação da frequência de descargas espontâneas destas células e recrutamento de outros circuitos sinápticos, gerando aumento no campo receptivo e respostas exageradas aos estímulos térmicos e/ou mecânicos, observados clinicamente como hiperalgesia e alodinia (Carvalho e Lemonica, 1998).

Muitos moduladores neuroquímicos estão envolvidos no surgimento e na manutenção da dor neuropática (Millan, 1999; Zimmermann, 2001; Mosley et al, 2006). Além disso, em virtude da lesão nervosa são produzidos diversos mediadores inflamatórios no local da lesão, os quais contribuem para os sinais característicos desse tipo de trauma. Dentre os mediadores químicos merece destaque a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem derivar de várias fontes, especialmente a partir de neutrófilos ativados (Winrow et al., 1993; Szabo, 1998; Khodr e Khalil, 2001; Mosley et al, 2006; Gardiner et al, 2009).

Estas espécies reativas são amplamente citadas como moléculas envolvidas nos processos fisiológicos do envelhecimento (Finkel e Holbrook, 2000; Tan et al, 2009), bem como na gênese de várias patologias devido aos danos ocasionados aos constituintes celulares (Lerouet et al., 2002; Boll et al., 2003; Hayashi, 2009). Sua formação ocorre em virtude dos processos do metabolismo energético celular. Esses, por sua vez, são baseados na produção de ATP, que ocorre pela transferência de elétrons ao longo da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Para a realização desses processos bioquímicos é necessária a presença de O₂ (oxigênio). No entanto,

durante a redução tetravalente do O_2 (Figura 2) ocorre a formação de intermediários metabólicos, as chamadas EROs, as quais são responsáveis pela toxicidade do O_2 já que estas moléculas apresentam elétrons desemparelhados em sua configuração eletroquímica. As principais EROs formadas *in vivo* são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); o radical hidroxila ($\cdot OH$); radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot}) e o oxigênio *singlet*, forma excitada do O_2 (1O_2).

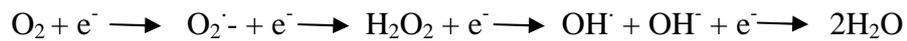


Figura 2: Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies reativas de O_2 são formadas no processo (ver texto para melhor compreensão).

A transferência de elétrons é realizada por um complexo multiprotéico enzimático da mitocôndria, a citocromo oxidase, em distintas etapas. Sua estrutura, contendo grupamentos heme férricos e íons cobre visa garantir a ligação resistente a estes intermediários reduzidos, muito reativos. Ainda assim, pequenas quantidades destes são perdidas ao longo da cadeia transportadora de elétrons, estando livres para reagir com moléculas da vizinhança (Ribeiro et al, 2005; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Existe nas células uma variedade de enzimas que utilizam o oxigênio na oxidação de substratos, como D-aminoácido oxidases e a xantina oxidase. Outros requerem o oxigênio para a adição de grupamentos hidroxil, como a prolina e lisina hidroxilases (síntese do colágeno) e a tirosina hidroxilase, na síntese de catecolaminas. Outro importante grupo de enzimas que emprega o oxigênio na oxidação de diversos produtos do metabolismo e xenobióticos é o citocromo P450, distribuído no retículo endoplasmático e organelas de plantas e animais. Assim como na cadeia de elétrons, ocasionalmente pode haver escapes de EROs ao longo de qualquer uma destas reações enzimáticas descritas. Menos frequentemente, nos sistemas biológicos ocorre a geração de EROs pela quebra de ligações covalentes entre as moléculas, pelo efeito das radiações ultravioleta e ionizante, ou de altas temperaturas (Zangar et al., 2004; Lewén et al., 2000).

A presença de metais de transição, como o ferro e o cobre, favorece a formação do mais reativo dos radicais, o hidroxil, a partir da reação do metal com o peróxido de hidrogênio conhecida como reação de Fenton, mostrada a seguir:



A própria natureza química de uma estrutura presente em todas as células, a membrana celular, favorece a formação de radicais peroxila e alcoxila, decorrente da decomposição dos peróxidos orgânicos (ROOH) presentes pela ação do calor, da exposição à radiação ultravioleta ou interação com metais. Entretanto, a ação das EROs é, sem dúvida, a maior responsável pela oxidação das membranas (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Locais ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como o SNC, são particularmente suscetíveis à lipoperoxidação. Alterações na conformação das membranas e perda da integridade funcional, bem como a injúria decorrente da ação de subprodutos da oxidação lipídica resultam da lipoperoxidação (Lewén et al., 2000).

Frente à ação fortemente oxidante do oxigênio, e às diversas situações onde a geração de EROs escapa ao controle, são previstas consequências deletérias aos componentes celulares, caso aqueles não sejam eliminados, ou neutralizados por um eficiente sistema antioxidante. Assim, fisiologicamente deve haver um equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade de sistemas de defesa antioxidante. Estas defesas antioxidantes exercem seu papel de diferentes formas e em diferentes momentos, seja evitando a formação dos radicais, ou minimizando algum processo oxidativo já desencadeado. A importância relativa de cada uma delas, portanto, depende destas peculiaridades. Os mais eficientes são enzimas que removem cataliticamente as EROs após sua formação. Dentre estas podem ser citadas a superóxido-dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx).

A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido – formado principalmente na mitocôndria - em peróxido de hidrogênio, que atravessa facilmente as membranas das células e das organelas, e pode posteriormente ser neutralizado pela ação das peroxidases CAT e GPx, resultando na formação de água e oxigênio. Embora o radical superóxido sozinho não represente maior risco à célula, sua combinação com o óxido nítrico circulante resulta em um forte oxidante, o peroxinitrito, cujos produtos de

decomposição são igualmente reativos (radical hidroxil e óxido nítrico). A SOD é uma metaloproteína que existe praticamente em todas as células, possuindo uma isoforma citosólica ligada ao cobre e ao zinco, e uma isoforma mitocondrial ligada ao manganês (Fridovich, 1998; Mruk et al., 2002).

A CAT é uma hemoproteína amplamente distribuída nos peroxissomas e membranas mitocondriais do organismo, especialmente no fígado, rins e eritrócitos (Mruk et al., 2002; Nishikawa et al., 2009). Como já mencionado, ela catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, cujo maior perigo está em sua interação com metais formando o radical hidroxil. O peróxido é formado via ações das enzimas SOD, glicose oxidase, monoamina oxidase, entre outras. Tanto a CAT quanto a GPx, outra importante detoxificadora de peróxidos, são encontradas em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Baud et al., 2004). A GPx, por sua vez, catalisa a conversão tanto do peróxido de hidrogênio quanto de hidroperóxidos orgânicos em produtos menos reativos, empregando para isso a glutathione em sua forma reduzida (GSH) como doador de elétrons. A forma oxidada do tripeptídeo glutathione (GSSG) é novamente reduzida pela ação da enzima glutathione redutase (GR) e do NADPH como doador de elétrons. Existem ao menos quatro tipos distintos de GPx. A forma mais ubíqua é a GPx1, citosólica. As outras formas, GPx2, 3 e 4 são encontradas principalmente no plasma, intestino e gônadas, respectivamente (Baud et al., 2004).

Neste contexto de substâncias oxidáveis e seus redutores, outro importante antioxidante que atua nos compartimentos hidrofílicos é o ácido ascórbico, que em fluidos biológicos encontra-se sob a forma do ânion ascorbato. As mais elevadas concentrações são encontradas nas adrenais e no SNC e, neste último, em maior abundância na região cortical em relação às regiões mais posteriores, como o tronco encefálico. Os primatas e os seres humanos não possuem a enzima capaz de catalisar a última etapa de síntese do ácido ascórbico e, ao contrário da maioria dos outros animais que são capazes de sintetizá-lo (no fígado e rins), precisam obtê-lo da dieta. Em função de o ácido ascórbico apresentar características polares, esta molécula tem dificuldade de atravessar livremente as membranas celulares e mesmo a barreira hematoencefálica, de modo que seu transporte para o interior do SNC é realizado por transporte ativo sódio-dependente no plexo coroideo e, uma vez no meio extracelular do interstício nervoso, adentra as células nervosas pelo trocador glutamato-ascorbato, onde permanece em maior concentração (Rice, 2000). Suas propriedades antioxidantes estão relacionadas à sua capacidade como doador de elétrons a

espécies radicais, formando o semidehidroascorbato (na perda de um elétron) e dehidroascorbato (na perda de dois elétrons) (Figura 3). As formas oxidadas são recicladas pela GSH, que por sua vez é reciclada pela GSH redutase (Rice, 2000; Patra et al, 2001).

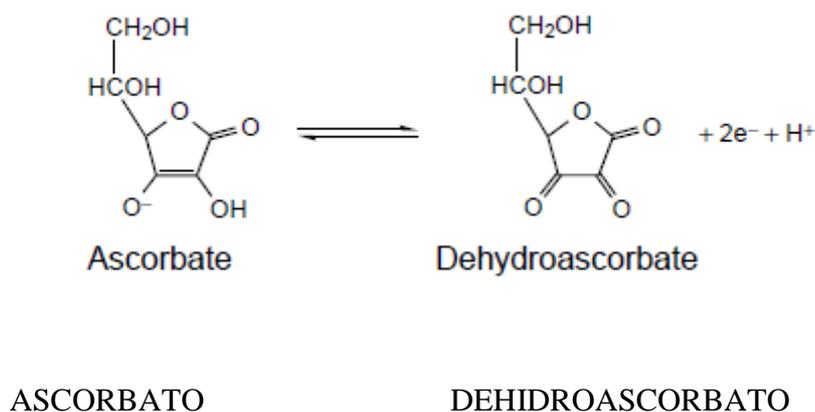


Figura 3 – Estrutura molecular do ácido ascórbico, como ânion monovalente, ascorbato, e sua forma oxidada, o dehidroascorbato, formado a partir da perda de dois elétrons e um próton (Rice, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que as lesões nervosas periféricas provocam aumento no metabolismo e acréscimo na respiração celular no local da lesão, consequentemente aumentando a formação de superóxido e peróxido de hidrogênio no sítio de injúria e em suas imediações (Gazda et al, 2001). A mielina é um dos alvos das EROs por seu alto teor lipídico (Radi et al, 1991) e baixa concentração de antioxidantes (Romero, 1996). Estas condições permitem o estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo no local da lesão. Além disso, as EROs facilitam a excitabilidade nervosa (Stahl et al, 1993) e seu acréscimo está associado a quadros de dor exacerbada induzida pela lesão nervosa periférica (Khalil et al, 1999; Levy et al, 1999). Estas mudanças contribuem para as alterações que desencadeiam alodinia e hiperalgesia (Gazda et al, 2001).

Estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Neurobiologia Comparada, desta Universidade, demonstraram que a secção unilateral completa do nervo isquiático ocasiona redução na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT

na medula espinal de ratos, sugerindo a participação das EROs no processamento nociceptivo (Guedes et al., 2006). Para elucidar essa questão, este mesmo grupo determinou a concentração do H_2O_2 na medula espinal de ratos submetidos à secção unilateral completa do nervo isquiático, e evidenciou aumento desta ERO após este procedimento. Demonstrou ainda acréscimo de um composto formado a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, o 4-hidroxi-2-nonenal (Guedes et al., 2008) e aumento na atividade da enzima GPx (Guedes et al., 2009). A partir disso, formulou-se a hipótese de que moléculas oxidantes e antioxidantes estariam envolvidas em alterações no tecido nervoso central decorrente da lesão periférica. Como as entradas nociceptivas, na medula espinal, resultam em sensibilização central nestes neurônios, a qual se caracteriza por aumento na excitabilidade neuronal no corno dorsal (Schaible e Richter, 2004; Siniscalco et al, 2007; Takeuchi et al, 2007), esta maior excitabilidade poderia ser transmitida aos centros superiores de projeção destes neurônios. Neste sentido, um estudo recente mostrou que a secção de nervo periférico provoca aumento na expressão de canais de sódio em neurônios localizados no núcleo ventral posterior lateral do tálamo, o que evidencia excitabilidade aumentada nestas células (Zhao et al., 2004, Huang e Song, 2008).

Na clínica médica é muito comum a ocorrência de injúria parcial ou incompleta de nervo periférico. Esta observação levou ao desenvolvimento do modelo de constrição nervosa crônica por Bennett e Xie (1988), o qual permite detectar tanto a dor espontânea como a evocada. Além disso, está demonstrado que este modelo se assemelha a muitas síndromes dolorosas dos humanos, como é o caso da síndrome do túnel do carpo (McMahon et al, 2006).

Com relação às EROs, foi demonstrado que o estresse oxidativo é um importante determinante das consequências neuropatológicas e comportamentais decorrentes da constrição de nervo periférico (Wagner et al, 1998). Neste estudo a administração de N-acetilcisteína, um agente antioxidante, reduziu a hiperalgesia dos animais. Posteriormente, outro estudo demonstrou que a constrição crônica do nervo isquiático de ratos ocasiona aumento na concentração do metabólito malondialdeído no nervo com constrição, havendo ainda neste nervo redução da glutathione reduzida e aumento na atividade da SOD. A CAT não alterou sua atividade local nestes animais (Naik et al., 2006). Um estudo recente demonstrou que um nervo submetido à constrição crônica aumenta a liberação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a concentração total de cálcio (Muthuraman et al., 2008). Estes dados sugerem o

envolvimento de moléculas oxidantes e antioxidantes nos mecanismos de codificação e transmissão da informação nociceptiva neste modelo de dor neuropática.

Contudo, os estudos até agora realizados utilizaram apenas tecidos periféricos, não estando ainda demonstrados os efeitos desta condição experimental no SNC. Como a medula espinal é a porta de entrada desta informação no SNC, a qual é posteriormente enviada para núcleos neuronais localizados no tronco encefálico e prosencéfalo (Mcmahon et al, 2006), e dado que diversas moléculas de sinalização mostram alterações em suas atividades nestas regiões neurais após a indução de lesão nervosa periférica (Mason et al., 2002; Apkarian et al., 2006; Saadé et al., 2007; Navarro et al., 2007; Uçeyler et al., 2008), este estudo mostrou os efeitos temporais da constrição do nervo isquiático sobre marcadores oxidativos na medula espinal, tronco encefálico e neocórtex de ratos.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Este estudo avaliou os efeitos da constrição unilateral do nervo isquiático, um modelo de dor neuropática, sobre parâmetros oxidativos no sistema nervoso central (medula espinal, tronco encefálico e neocórtex) de ratos, considerando nesta avaliação os períodos experimentais de 3 e 10 dias a fim de determinar a variação temporal destes indicadores após a lesão periférica.

Objetivos Específicos

- Avaliar, mediante o emprego do teste dos Filamentos de Von Frey, o qual avalia a sensibilidade mecânica, os efeitos da constrição unilateral do nervo isquiático sobre essa sensação em ratos controle, com manipulação (*Sham*) ou com constrição deste nervo, antes da lesão e aos 3 e 10 dias após a lesão periférica;
- Avaliar, mediante o emprego do teste da placa quente, o qual avalia a sensibilidade térmica, os efeitos da constrição unilateral do nervo isquiático sobre essa sensação em ratos controle, com manipulação (*Sham*) ou com constrição deste nervo, antes da lesão e aos 3 e 10 dias após a lesão periférica;
- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a manipulação e a constrição unilateral do nervo isquiático, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em

homogeneizado de medula espinal lombossacral, tronco encefálico e neocórtex de ratos controle, com manipulação (*Sham*) ou com constrição deste nervo;

- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a constrição unilateral do nervo isquiático, a concentração do antioxidante ácido ascórbico em homogeneizado de medula espinal lombossacral, tronco encefálico e neocórtex de ratos controle, com manipulação (*Sham*) ou com constrição deste nervo;

- Determinar, ao terceiro e décimo dias após a manipulação e a constrição unilateral do nervo isquiático, a peroxidação lipídica, por meio da técnica do xilenol laranja, em homogeneizado de medula espinal lombossacral, tronco encefálico e neocórtex de ratos controle, com manipulação (*Sham*) ou com constrição deste nervo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais: Procedência e Manutenção

Foram utilizados neste estudo 30 ratos da linhagem *Wistar*, adultos, machos, com peso de 200-300g, os quais foram obtidos do Biotério Central da UFRGS, com 60 dias de vida. Estes animais permaneceram no ratário do Departamento de Farmacologia, desta mesma universidade após os procedimentos cirúrgicos, onde foram alimentados com ração padrão *ad libidum* e mantidos sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (22-24°C). Para a realização dos experimentos, os animais foram separados aleatoriamente e acondicionados em caixas de plástico adequadas (três animais/caixa), com assoalho de maravalha e livre acesso à alimentação e água. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. O projeto que deu origem a este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (cadastro CEP: 2008052).

2. Procedimentos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais, cada um composto por seis animais:

a) **Grupo Controle:** animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção cirúrgica;

b) **Grupo Sham:** animais que sofreram a incisão dos tecidos até a visualização do nervo isquiático. Este grupo foi subdividido em dois subgrupos, conforme o tempo entre a cirurgia e a morte do animal, resultando nos subgrupos Sham 3 dias e Sham 10 dias, cada um com seis animais;

c) **Grupo com Constrição:** animais em que o nervo isquiático foi isolado e recebeu em seu tronco comum quatro amarraduras. Este grupo foi subdividido em dois subgrupos, conforme o tempo entre a constrição nervosa periférica e a morte do animal, resultando nos subgrupos CI (constrição do nervo isquiático) 3 dias e CI 10 dias, cada um com seis animais.

As estruturas nervosas centrais escolhidas para estudo foram: segmento lombossacral da medula espinal, por ser a região de entrada das fibras aferentes do nervo isquiático; tronco encefálico e neocórtex, importantes regiões no processamento da dor (integração dos mecanismos nociceptivos e entradas de outras regiões centrais). Os períodos experimentais considerados foram 3 e 10 dias, correspondentes aos períodos pós-cirúrgicos em que foi realizada a decapitação dos animais *sham* e CI para a remoção dos tecidos. Os ratos controle foram mortos por decapitação nestes mesmos períodos experimentais, ou seja, aos 3 e 10 dias. Porém, em cada um destes intervalos foram mortos três (03) ratos. Devido à semelhança nos valores de seus resultados experimentais, estes foram agrupados em um único grupo. Para uma melhor compreensão, o número de animais de cada grupo e a organização dos grupos como mencionado estão ilustrados na tabela abaixo:

Tabela 01 – Organização dos grupos experimentais

<i>Grupo experimental</i>	<i>Número de animais</i>
Controle	n = 6
<i>Sham</i> 03 dias	n = 6
<i>Sham</i> 10 dias	n = 6
CI 03 dias	n = 6
CI 10 dias	n = 6

Sham: animais em que o nervo isquiático foi isolado e manipulado, mas não ocorreu constrição. CI (constrição no nervo isquiático): animais em que o nervo isquiático foi isolado e recebeu quatro amarraduras em seu tronco comum.

Os ratos dos diferentes grupos experimentais foram submetidos aos testes de sensibilidade mecânica (teste de Von Frey) e térmica (teste da placa quente). Estes

testes foram realizados antes da cirurgia e no dia da morte dos animais. No dia da morte, os ratos foram submetidos aos testes de sensibilidade e, em seguida, mortos por decapitação para a obtenção dos tecidos nervosos, os quais foram imediatamente pesados e congelados em nitrogênio líquido para posteriores dosagens bioquímicas.

3. Constrição do nervo isquiático (CI)

Para o procedimento de CI, os ratos foram previamente anestesiados com solução mista de cetamina (90 mg/kg de peso corporal) e xilazina (10 mg/kg de peso corporal). Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e tiveram seu membro posterior direito fixado em uma superfície rígida para a incisão dos tecidos moles e visualização do nervo isquiático. A intervenção cirúrgica iniciava após tricotomia e assepsia da pele da coxa direita do animal com álcool-iodado 2%. Feito este procedimento, seguia-se a incisão cutânea e subcutânea longitudinal do membro, no terço médio da coxa, para expor o músculo bíceps femoral, o qual era afastado para permitir a visualização do nervo isquiático. O procedimento de constrição deste nervo foi realizado de acordo com a técnica descrita por Bennett e Xie (1988), a qual está esquematicamente mostrada na Figura 04. A constrição compreendia 4 amarraduras com fio de sutura do tipo *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon) em torno do nervo, com uma distância de 1mm entre elas. Assim, o comprimento afetado do nervo foi de aproximadamente 5 mm. O grau de contrição foi determinado pela percepção do pesquisador do movimento reflexo da pata lesionada do rato à medida que o aperto do nó de sutura era efetuado. Todas as constrições foram feitas pelo mesmo pesquisador para que a percepção do grau de constrição fosse a mesma aplicada a todos os animais. Este grau de constrição retarda, mas não interrompe totalmente a circulação sanguínea da superfície epineural. Finalizado este procedimento, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville) e desinfetado com solução de rifamicina.

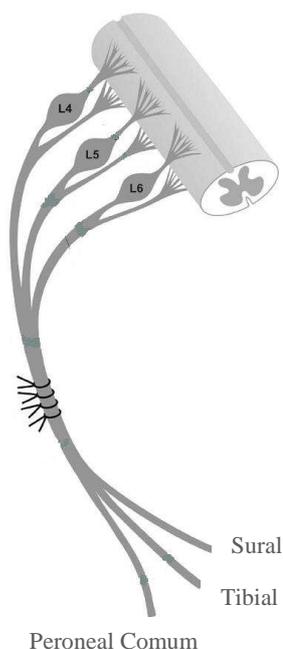


Figura 04. Esquema de um segmento da medula espinal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal. Nas raízes dorsais estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5 e L6) do nervo isquiático, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o nervo peroneal comum. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras (Baseado em Klusáková e Dubový, 2009).

Os animais pertencentes ao grupo *sham* foram submetidos ao procedimento anestésico e de isolamento do nervo isquiático, porém não sofreram nenhuma constrição neste nervo. Os animais do grupo controle não passaram por nenhuma intervenção cirúrgica.

4. Teste de Von Frey

Os animais dos grupos *sham* e CI, dos períodos 3 e 10 dias, foram testados para determinação de sua sensibilidade mecânica antes e depois do procedimento cirúrgico. Paralelamente, foram avaliados os animais controle para comparações com as medidas dos grupos lesionados. Para a realização do teste, os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro (12x20x20 cm) apoiadas sobre uma

superfície elevada e revestida por tela metálica (Figura 5A). Após aclimatação neste ambiente por 10 minutos, foram aplicados estímulos de ordem crescente de força na superfície plantar da pata posterior direita (ipsilateral à lesão), utilizando-se Filamentos de Von Frey (North Coast Medical, Inc, USA) de 10 a 100 g (Figura 5B). A força em questão pode ser alcançada pelo dobramento do filamento (Figura 5C), o qual foi aplicado 3 vezes durante 3 s cada. Foram consideradas como respostas positivas aquelas em que o animal realizou o movimento de retirada do membro posterior imediatamente após o estímulo mecânico, e não as respostas seguidas de caminhada. Foi registrada a menor força (filamento de menor peso) capaz de gerar uma resposta de retirada da pata sob o estímulo mecânico. Ao término do teste na pata ipsilateral à lesão, o mesmo procedimento foi realizado na pata contralateral à lesão (pata posterior esquerda), para que fosse feita a comparação entre os limiares de hipersensibilidade mecânica da pata lesionada e da contralateral. Os testes foram feitos antes da cirurgia e no dia da morte dos animais nos diferentes períodos de tempo considerados neste estudo. Sempre foram realizados em ambiente silencioso e ao início da manhã. Os resultados estão representados por gramas do filamento a que os animais responderam nos testes pré e pós-cirúrgicos nos períodos antes da cirurgia e aos 3 ou 10 dias após a lesão.

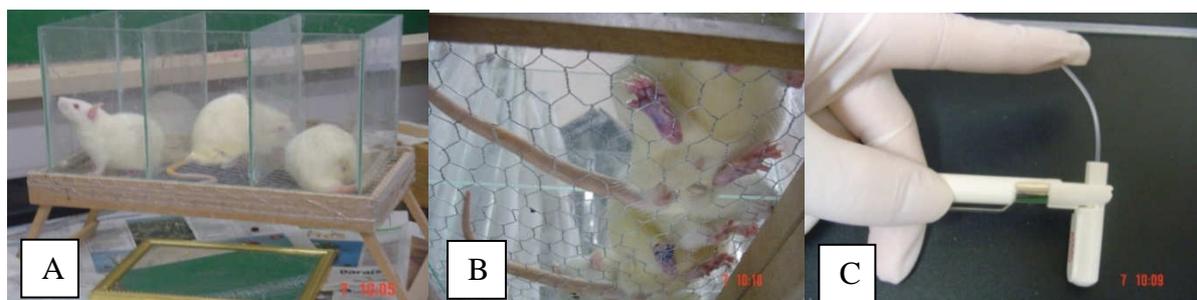


Figura 05 – Aparelho utilizado no teste de Von Frey. A) Caixas individualizadas apoiadas em uma superfície elevada de madeira, cujo assoalho é revestido por tela e as laterais por vidro. Cada compartimento comporta um rato. Abaixo do aparelho encontra-se um espelho, o qual é empregado para melhor visualização da porção inferior das patas dos ratos. B) Detalhe da porção inferior dos compartimentos mostrados em A para visualização do revestimento em tela onde se nota as porções plantares de patas posteriores de ratos. As aberturas da tela permitem a aplicação do filamento de Von Frey em uma determinada região da pata do rato. Note como este filamento se curva ao ser aplicada uma força em sua extremidade superior (C).

5. Teste da Placa Quente

Para a determinação da hipersensibilidade térmica dos grupos constrição nervosa periférica, *Sham* e controle realizou-se o teste da placa quente. Para isto cada animal foi inicialmente aclimatado, por um período de 5 minutos, no aparelho (Figura 06) em temperatura ambiente. Após este procedimento, a placa foi aquecida à temperatura de 50° C. Então, cada animal foi colocado sobre a placa e, neste momento, foi disparado o cronômetro do equipamento para mensuração do tempo de latência de retirada da pata. Assim que o animal apresentou o reflexo de retirada da pata, o mesmo foi rapidamente retirado da placa aquecida para evitar lesão tecidual, e o tempo decorrido até o início do reflexo de retirada foi anotado e considerado como limiar de sensibilidade térmica. Os testes foram realizados antes da cirurgia e no dia da morte dos animais, ou seja, aos 3 e 10 dias após a realização do procedimento cirúrgico. Estes testes sempre foram realizados em ambiente silencioso e ao início da manhã. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média da latência pré e pós-cirúrgicas dos ratos *Sham* ou CI nos períodos de 3 ou 10 dias após a lesão.



Figura 06 – Aparelho utilizado no teste da placa quente. Note o rato sobre a placa quente, cujos indicadores luminosos mostram temperatura de 50° C (à esquerda) e marcador de tempo em segundos (à direita).

6. Remoção do tecido nervoso e preparação das amostras

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação para a retirada imediata do segmento lombossacral da medula espinal, do tronco encefálico e de todo o neocórtex. Estes tecidos foram imediatamente colocados em *ependorfs* e congelados em nitrogênio líquido para posterior homogeneização. Para as determinações bioquímicas, o tecido foi descongelado e homogeneizado em solução contendo KCl 1,15% (5 mL/g de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mmol/L em isopropanol (10 μ L/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para evitar a degradação das proteínas, principalmente as enzimas analisadas neste estudo. O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 1000 g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante resultante deste processo constituiu a amostra que foi mantida em freezer a -60°C até a realização das medidas de atividade enzimática e quantificação dos compostos químicos (Llesuy et al., 1985).

7. Quantificação de proteínas

Para as medidas de atividade enzimática e determinação do ácido ascórbico, as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL, a partir da qual se constrói uma curva de calibração e calcula-se um fator de correção médio, que é utilizado para posterior cálculo da concentração de proteínas das amostras.

Foram utilizados os seguintes reagentes: Reativo de Folin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção 1:3; Reativo A: NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N; Reativo B1: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1%; Reativo B2: $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2%, para preparação final do Reativo C: 50 mL de Reativo A mais 0,5 mL de Reativo B1 e 0,5 mL de B2.

Para a determinação da concentração de proteínas das amostras foram colocados 20 µL de cada amostra em 780 mL de água destilada e 2 mL de reativo C, preparado no momento do ensaio. Após dez minutos, se adicionou ao tubo de ensaio 0,2 mL de Reativo de Folin Ciocalteau, se agitou e aguardou 30 minutos para a realização da leitura em espectrofotômetro (Analyser® 850M) a um comprimento de onda de 625 nm.

Foram realizadas duplicatas para todas as amostras, sendo utilizada para fins de cálculo, a média das absorbâncias obtidas nas duas leituras.

8. Atividade da enzima Superóxido Dismutase

Fridovich e Misra propuseram, em 1972, um ensaio para quantificar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) por meio da inibição que esta demonstrou exercer frente à auto-oxidação da adrenalina. Esta catecolamina sofre auto-oxidação quando em meio básico, sendo mais intenso e veloz o processo em pH entre 10 e 11. A reação envolve a geração de radicais livres, especialmente o ânion superóxido, que contribui com a perpetuação da oxidação. Para tanto o método avalia, indiretamente, a ação enzimática da SOD, que ao neutralizar os radicais superóxido evita a oxidação da adrenalina em adrenocromo, um subproduto colorido que pode ser medido a 480 nanômetros.

Inicialmente realizou-se uma leitura, em espectrofotômetro de feixe duplo Cary (Varian) da auto-oxidação natural da adrenalina, em meio contendo tampão glicina pH 11,3, por cerca de 90 s. A leitura resulta em uma curva, cuja porção ascendente indica a formação de adrenocromo, até o ápice da curva, a partir de onde observa-se um decaimento que indica a oxidação deste em outros compostos com absorção máxima não mais em 480 nm, e por isso não detectáveis. As absorbâncias interessantes são aquelas do início e fim do segmento da curva mais acentuado, representando o período mais intenso da reação.

Após realizou-se a leitura das amostras, cada qual nos volumes de 15 e 30 µL. Colocou-se o primeiro volume de amostra na cubeta, em meio contendo tampão glicina pH 11,3, e zerou-se o equipamento. A seguir, adicionou-se 50 µL de adrenalina e observou-se a formação de curva semelhante à primeira, porém de menor amplitude, proporcionalmente ao teor de SOD presente na amostra.

O tampão foi preparado na concentração de 50 mM de glicina (Vetec®), em água ultrapura, e seu pH foi ajustado à 11,3 com hidróxido de sódio (F. Maia®) em pérolas. A solução de adrenalina (Sigma®) foi preparada na concentração de 60 mM, em água ultrapura. O pH desta solução deve ficar em 2,0, podendo ser ajustado com ácido clorídrico, se necessário.

O ensaio proporciona uma medida indireta da atividade enzimática, e por isso os resultados são expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína, que representa a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de auto-oxidação da adrenalina.

9. Atividade da enzima Catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida por meio da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, já que este é o comprimento de onda onde há maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Foram utilizadas cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda em que são realizadas as medidas. Os reagentes utilizados foram: solução tampão fosfato a 50 mmoles/L (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 M.

Em cubeta de quartzo, colocou-se 980 µL de tampão fosfato e 5 µL de amostra, homogeneizados previamente preparados. Esta cubeta foi colocada no espectrofotômetro (modelo Cary, Varian) e descontada contra um branco de tampão fosfato. Em seguida, adicionou-se 15 µL de peróxido de hidrogênio e foi monitorada a diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado, ou seja, a decomposição do peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em picomoles por miligrama de proteína (pmoles/mg proteína) (Aebi, 1984; Boveris e Chance, 1973; Webster e Nunn, 1988).

10. Quantificação do ácido ascórbico

O ensaio de quantificação do ácido ascórbico foi realizado conforme descrito por Roe e Kuether (1942), com adaptações elaboradas e padronizadas em nosso laboratório (Lab. Neurobiologia Comparada). Inicialmente as amostras foram centrifugadas, sob refrigeração, por 5 minutos a 3000 g e o sobrenadante foi separado para o ensaio. Preconizou-se uma curva padrão de ácido ascórbico (AA) (Synth®) com as seguintes quantidades: 0,0015 mg; 0,00375 mg; 0,0075 e 0,0150 mg. Preparou-se então uma solução de AA de 10 mg/mL e a partir desta uma solução de 0,100 mg/mL, a qual foi distribuída, em duplicata, em tubos *ependorfs* nos volumes 20, 50, 100 e 200 microlitros e completados até 400 μ L com ácido tricloroacético 4% (Vetec®). O conteúdo destes foi então agitado com carvão ativado (Synth), de granulometria 1-2 mm, tratado previamente com ácido clorídrico 10 %, para conversão do AA em sua forma oxidada. Após, separou-se 300 microlitros desta solução, adicionou-se 10 microlitros de solução de tiouréia 10% (Vetec®), 75 microlitros de 2,3-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 2% (Sigma) e encaminharam-se os *ependorfs* para banho-maria a 37°C por 3 horas. Terminado este tempo adicionou-se 375 microlitros de ácido sulfúrico 85% (Nuclear®), gota a gota, com os *ependorfs* em banho de gelo, e aguardou-se 30 minutos para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 540 nanômetros. Na presença de AA desenvolve-se uma coloração alaranjada, proporcional à concentração. As amostras tiveram o mesmo tratamento, porém com a adição de ácido tricloroacético ocorre desproteinização, sendo necessário centrifugar novamente os *ependorfs* por breve período, e seguir o ensaio utilizando o sobrenadante obtido. A partir da curva padrão de AA e regressão linear obtém-se o resultados em nanomoles de ácido ascórbico/miligrama de proteína (nM AA/mg proteína).

11. Técnica do Xilenol Laranja para determinação da Peroxidação lipídica

A lipoperoxidação foi determinada segundo a técnica descrita originalmente por Jiang e cols. (1991). O método baseia-se na reação de oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} na presença de hidroperóxidos lipídicos (lipoperóxidos) e formação de complexos de Fe^{3+}

com xilenol laranja (xylenol orange, XO). Segundo a técnica adaptada de Södergren e cols. (1998), para cada amostra foram utilizados brancos de ROOH reduzidos com trifenilfosfina (TPP), a trifenilfosfina reduz especificamente os hidroperóxidos.

Foram utilizados os reagentes: MeOH (metanol absoluto) 90%; Xilenol laranja (XO - o-cresol sulfoneftalein-3,3'-metilaminodiacético) 2 mmoles/L em MeOH 90%; H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 1 mol/L; (NH₄)₂Fe(SO₄)₂.6H₂O (Sulfato ferroso amoniacal) 10 mmoles/L em H₂SO₄ 25mmoles/L; e 2,6-Di-ter-butil-4-metilfenol (BHT) 40 mmoles/L em MeOH 90%; e Trifenilfosfina (TPP) 1mmoles/L em MeOH absoluto.

O reagente de trabalho (RT-XO) foi preparado misturando-se os reagentes na seguinte ordem: 81% (v/v) de MeOH 90%, XO 2mmoles/L para concentração final de 100 µM, H₂SO₄ 1 mol/L para concentração final de 25 mmoles/L, BHT 40 mmoles/L para concentração final de 4mmoles/L e sulfato ferroso 10 mmoles/L para concentração final de 250 µmoles. A mistura foi agitada em vórtex e usada em seguida.

As amostras preparadas previamente em BHT 40 mmoles/L para determinação de lipoperoxidação pelo método de xilenol laranja foram diluídas na concentração de 1:5 antes do ensaio e separadas em dois grupos (com 90 µL de amostra cada), um no qual foi adicionado metanol absoluto (10 µL) e outro no qual foi acrescentado TPP 1 mmoles/L (10 µL). Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente.

Durante o ensaio foi pipetado em microplaca de 96 poços, 10 µL de amostra em quadruplicata (uma duplicata com metanol, para o ensaio de ROOH total, e outra duplicata com TPP), em seguida adicionou-se 90 µL do RT-XO. A placa foi agitada por 60 min à temperatura ambiente e então a absorbância a 560 nm obtida contra um branco de RT-XO em leitora de Elisa (Anthos Zenyth 200rt). Os valores de absorbância (abs) utilizados para os cálculos foram: $abs = abs_{ROOH\ total} - abs_{TPP}$, isto é, nos valores utilizados para cálculos foram descontados os valores obtidos das duplicatas com TPP. Os resultados foram expressos em nanomoles/miligramma de proteína (nM/mg de proteína).

12. Análise estatística

Os dados dos testes de hipersensibilidade mecânica (Teste de Von Frey) e térmica (Teste da Placa Quente) foram analisados pelo teste t de Student para amostras pareadas. Foram comparados os valores pré-lesão e pós-lesão dentro de cada grupo na análise dos resultados da placa quente e do teste de Von Frey na pata ipsilateral. Na análise dos resultados do teste de Von Frey nas patas ipsilateral e contralateral à lesão foram comparados apenas os valores pós-lesão obtidos em cada grupo experimental. Os testes bioquímicos foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. Os fatores considerados foram constrição e tempo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi $<0,05$. Para a realização dos testes empregou-se o programa Sigmastat versão 3.5.

O número de animais (n) necessário para os ensaios foi estabelecido com base no “ n ” empregado em experimentos similares realizados por outros alunos e pesquisadores no Laboratório de Neurobiologia Comparada (Guedes et al., 2006; 2008 e 2009) – número este considerado o mínimo para formar um subconjunto representativo da população em estudo.

RESULTADOS

1. Teste de Von Frey

Na pata ipsilateral à lesão, ou seja, na pata direita, não houve diferença estatisticamente significativa nas respostas pré-cirúrgicas obtidas nos grupos *Sham* e CI aos filamentos de Von Frey em nenhum dos grupos experimentais (Figura 07). Porém, a análise dos valores obtidos após a lesão em relação aos valores pré-lesão dentro de cada grupo experimental mostrou que, aos três dias após a constrição unilateral do nervo isquiático, a resposta da pata lesionada do grupo CI apresentou hipersensibilidade mecânica, ou seja, os animais deste grupo responderam aos filamentos de menor quantidade em gramas, sendo esta redução estatisticamente significativa quando comparada às medidas pré-lesão do grupo. Esta hipersensibilidade ainda estava presente aos 10 dias após a constrição, na pata ipsilateral à lesão (Figura 07). Dentro do grupo *Sham*, os ratos não mostraram redução significativa na resposta aos filamentos de Von Frey na pata ipsilateral à lesão tecidual, nos períodos de 3 ou 10 dias após a manipulação do nervo isquiático, não ocorrendo, assim, acréscimo da sensibilidade mecânica neste grupo experimental (Figura 07).

Quando foi feita a comparação das respostas de sensibilidade mecânica nas patas ipsilateral e contralateral à lesão, considerando-se apenas os resultados obtidos após a lesão periférica dentro de cada grupo experimental, o grupo *Sham* não mostrou mudanças estatisticamente significativas aos 3 ou 10 dias após o procedimento cirúrgico. Porém, nos animais do grupo CI, na pata com lesão nervosa periférica, a sensibilidade mecânica estava significativamente aumentada aos 3 dias, pois os animais responderam a filamentos de menor intensidade em gramas. Esta diferença significativa também ocorreu aos 10 dias após a constrição do nervo isquiático (Figura 08).

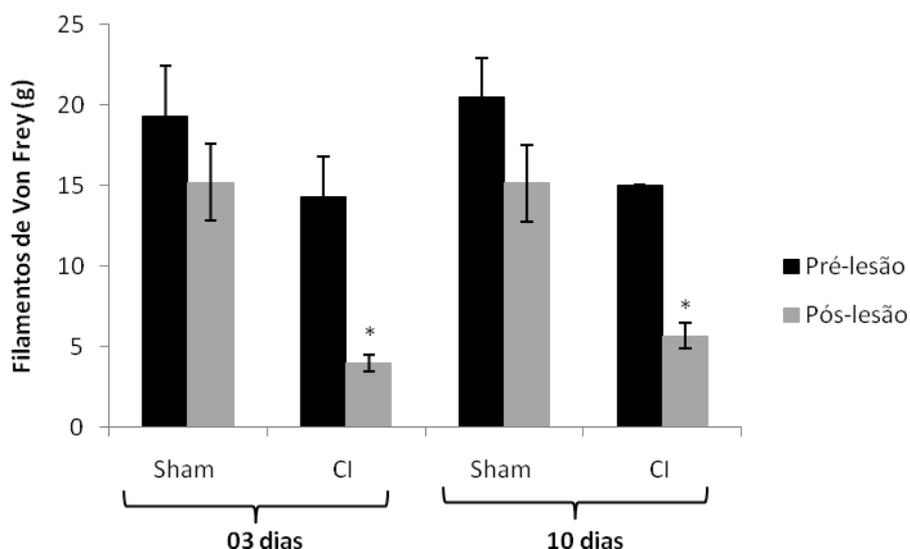


Figura 07: Respostas aos filamentos de Von Frey, em gramas (g - eixo da ordenada), aplicados na pata ipsilateral à lesão (direita). Estão representadas as respostas obtidas antes (pré-lesão) e após (pós-lesão) a lesão periférica nos ratos submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) nos períodos de 3 ou 10 dias após a lesão. * Diferença estatisticamente significativa entre as medidas pré e pós-cirúrgica (teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$).

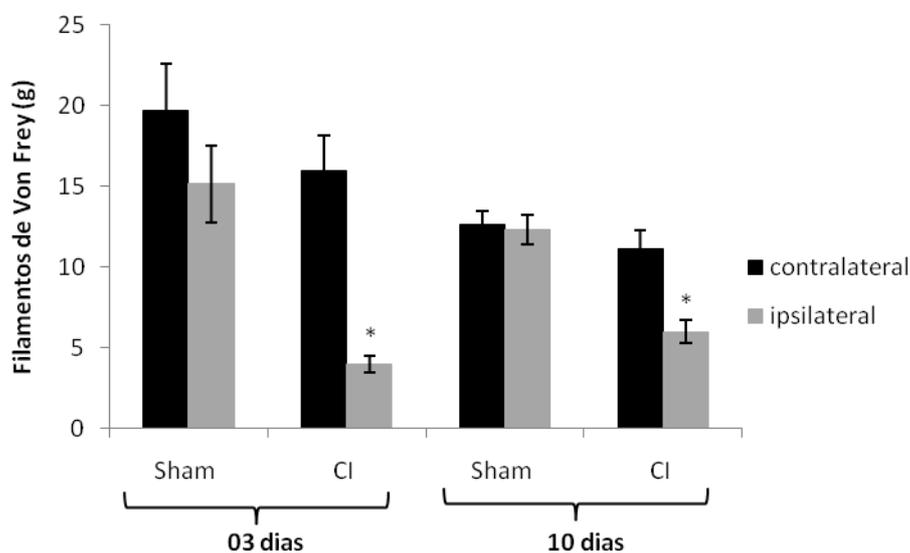


Figura 08: Respostas aos filamentos de Von Frey, em gramas (eixo da ordenada), aplicados nas patas ipsilateral e contralateral à lesão. Estão representadas as respostas obtidas após a lesão periférica nos ratos submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) nos períodos de 3 ou 10 dias após a lesão. * Diferença estatisticamente significativa entre as medidas das patas ipsilateral e contralateral à lesão (teste *t* de Student para amostras pareadas, $p < 0,05$).

2. Teste da Placa Quente

A latência das respostas obtidas antes da lesão periférica (pré-lesão) nos animais dos grupos *Sham* ou CI não diferiram significativamente no teste da placa quente em nenhum dos períodos considerados neste estudo. Esta latência de resposta também não mostrou modificações significativas dentro do grupo *Sham*, tanto aos 3 como aos 10 dias após a lesão periférica. Todavia, a latência de resposta ao teste da placa quente reduziu significativamente três dias após a constrição do nervo isquiático, o que indica aumento da sensibilidade térmica nos animais do grupo CI. Esta maior sensibilidade térmica ainda estava presente neste grupo aos 10 dias após a lesão nervosa periférica, mostrando que neste período ainda não ocorreu retorno aos valores basais da latência de resposta a este teste (Figura 09).

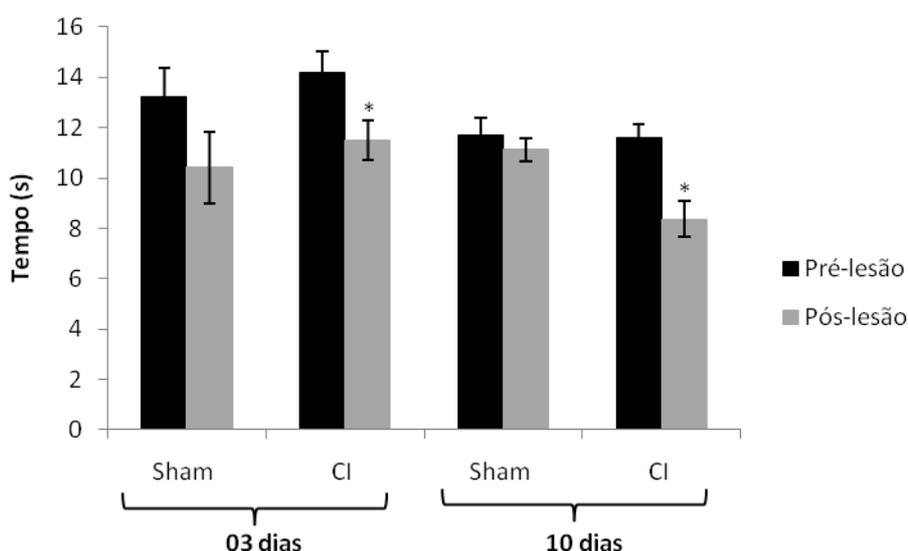


Figura 09: Média da latência (em segundos - s) das respostas ao teste da placa quente. Estão representadas as respostas obtidas antes (pré-lesão) e após (pós-lesão) a lesão nervosa periférica nos ratos submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) nos períodos de 3 ou 10 dias após a lesão. * Diferença estatisticamente significativa entre as medidas pré e pós-cirúrgica (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

3. Valores da atividade da enzima SOD

Na medula espinal, a atividade da enzima SOD estava reduzida aos 3 dias após a lesão periférica nos animais dos grupos *Sham* e CI. Porém, este decréscimo não foi estatisticamente significativo quando comparado aos valores obtidos nos ratos do grupo controle (controle: $6,6 \pm 1,1$; *Sham*: $3,9 \pm 0,8$; CI: $3,3 \pm 0,9$; $p < 0,07$ e $p < 0,19$ quando comparados controle e CI, e controle e *Sham*, respectivamente) (Figura 10A). Aos 10 dias após a lesão periférica, a atividade da SOD aumentou na medula espinal dos animais dos grupos *Sham* e CI. O acréscimo foi significativo quando comparado aos valores obtidos na atividade desta enzima aos 3 dias nestes dois grupos experimentais. Todavia, este novo valor foi similar àquele obtido no grupo controle (Figura 10A).

Similar ao que foi observado na medula espinal, a atividade da SOD também reduziu no tronco encefálico 3 dias após a lesão periférica nos grupos *Sham* e CI. Todavia, no tronco encefálico esta redução foi estatisticamente significativa quando comparada aos valores obtidos no grupo controle (Figura 10B). Aos 10 dias, a atividade da SOD ainda se encontrava significativamente reduzida no tronco encefálico dos ratos do grupo *Sham*, mas com valor similar ao do grupo controle nesta região do sistema nervoso central nos animais com constrição no nervo isquiático, o que mostra o retorno da atividade da SOD apenas no grupo CI (Figura 10B).

No neocórtex, a atividade da SOD aumentou apenas no grupo CI aos 3 dias após a lesão nervosa periférica. Este acréscimo foi estatisticamente significativo quando comparado aos valores obtidos nos grupos controle e *Sham* dos 3 dias. Neste período, os valores encontrados para a SOD no grupo *Sham* não mostraram mudanças significativas, sendo similares àqueles obtidos no grupo controle (Figura 10C). Todavia, aos 10 dias após a intervenção cirúrgica na periferia, a atividade da enzima SOD ainda estava significativamente aumentada no neocórtex dos ratos pertencentes ao grupo CI, sendo este valor similar àquele obtido neste grupo experimental aos 3 dias após a constrição do nervo isquiático. O grupo *Sham*, por sua vez, mostrou acréscimo na atividade da SOD aos 10 dias. Este aumento foi estatisticamente significativo quando comparado aos valores obtidos nos animais dos grupos controle e *Sham* dos 3 dias (Figura 10C).

Interessantemente, a atividade da SOD no neocórtex dos ratos pertencentes ao grupo controle foi praticamente a metade dos valores encontrados na medula espinal e tronco encefálico destes animais (Figura 10A, B, C).

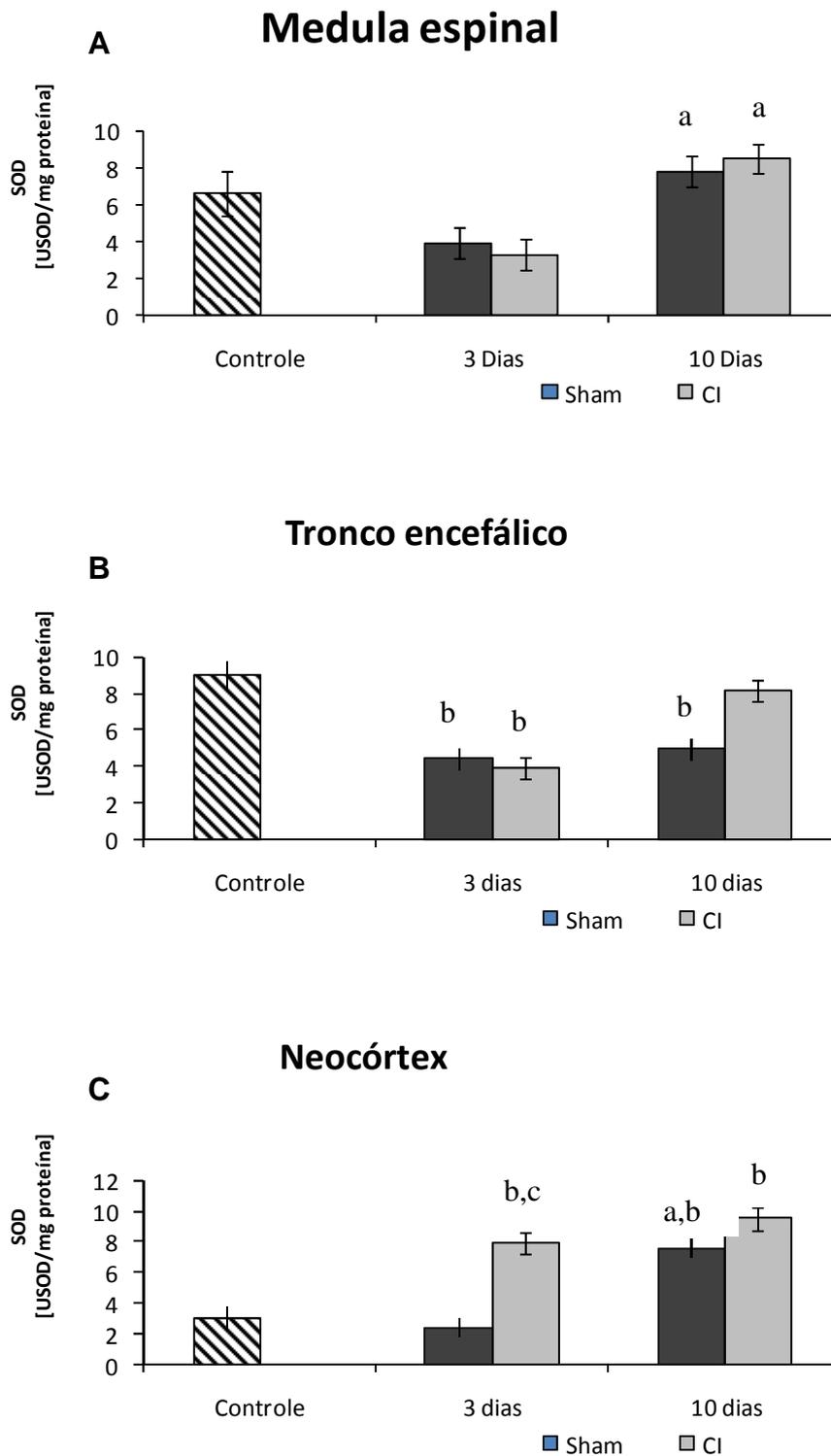


Figura 10 – Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) após 3 ou 10 dias da lesão. Os resultados estão expressos em média±erro padrão da média, n=6. (a) Indica diferença significativa quando comparado ao *Sham* e CI dos 3 dias; (b) indica diferença significativa quando comparado ao controle; (c) indica diferença significativa quando comparado ao *Sham* dos 3 dias ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni).

4. Valores da atividade da enzima Catalase

Na medula espinal, a atividade da enzima CAT não mostrou modificações significativas nos animais do grupo *Sham*, tanto aos 3 como aos 10 dias após a lesão periférica (Figura 11A). Todavia, a atividade desta enzima mostrou aumento estatisticamente significativo nos animais do grupo CI aos 3 dias após a constrição do nervo isquiático. Este acréscimo ainda estava presente aos 10 dias nesta região do tecido nervoso neste grupo de ratos. O aumento nestes intervalos de tempo foi significativo em relação aos valores dos grupos controle e *Sham* dos 3 ou 10 dias.

O tronco encefálico, por sua vez, não mostrou modificações significantes na atividade desta enzima aos 3 dias após a lesão periférica, tanto no grupo *Sham* como no CI (Figura 11B). Aos 10 dias após o procedimento cirúrgico, os animais do grupo *Sham* mostraram redução significativa na atividade da CAT, sendo que este novo valor diferiu tanto daqueles obtidos nos animais do grupo controle como dos grupos *Sham* e CI dos 3 dias. Já nos ratos com constrição do nervo isquiático, diferente do que ocorreu nos animais *Sham*, a atividade da CAT aumentou aos 10 dias, sendo este acréscimo significativo em relação aos valores obtidos nos grupos *Sham* aos 3 ou 10 dias, e no CI aos 3 dias. Porém, o novo valor de atividade da CAT não diferiu significativamente daquele encontrado nos animais do grupo controle (Figura 11B).

Interessantemente, os valores de atividade da CAT do tronco encefálico dos ratos controle foram sempre maiores do que aqueles observados na medula espinal e neocórtex (Figura 11B).

No neocórtex, a atividade da CAT nos ratos do grupo controle foi praticamente a metade dos valores obtidos na medula espinal e no tronco encefálico destes animais. A atividade desta enzima não mudou significativamente aos 3 dias após a lesão periférica. Isto ocorreu tanto no grupo *Sham* como naquele com constrição no nervo isquiático (Figura 11C). Este mesmo padrão de resposta foi observado aos 10 dias nos animais do grupo *Sham*. Entretanto, os ratos do grupo CI mostraram acréscimo significativo na atividade da CAT aos 10 dias após a constrição do nervo isquiático. Este aumento foi estatisticamente significativo em relação aos valores obtidos nos grupos controle e *Sham* 3 ou 10 dias, e ainda em relação aos valores do grupo CI obtido aos 3 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 11C).

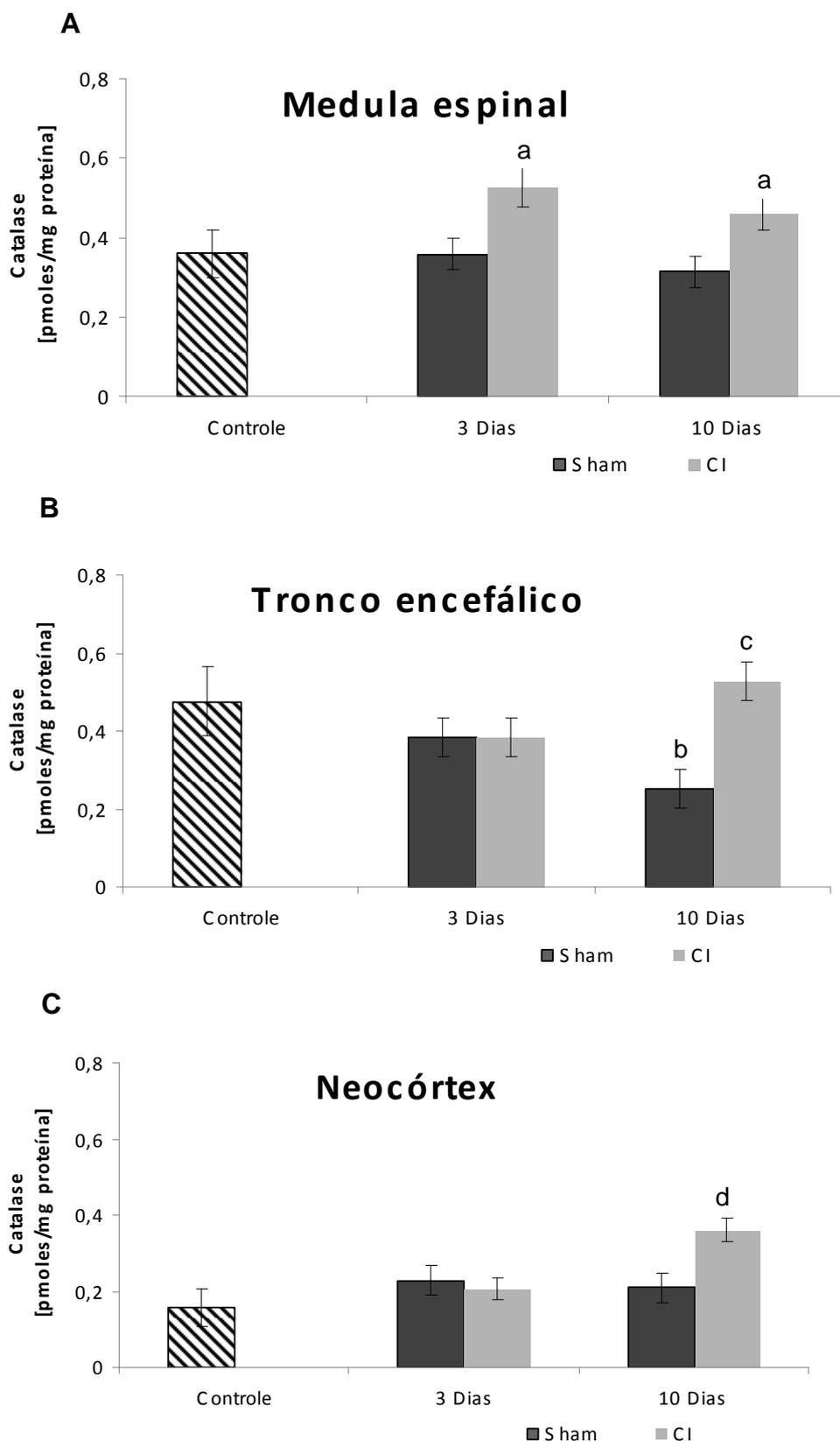


Figura 11 – Medida da atividade da enzima catalase em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) após 3 ou 10 dias da lesão. Os resultados estão expressos em média±erro padrão da média, n=6. (a) Indica diferença significativa quando comparado ao controle e ao *Sham* dos 3 e 10 dias; (b) indica diferença significativa quando comparado ao controle e ao CI dos 3 e 10 dias; (c) indica diferença significativa quando comparado ao *Sham* dos 3 e 10 dias e ao CI dos 3 dias; (d) indica diferença significativa quando comparado ao controle, ao *Sham* dos 3 e 10 dias e ao CI dos 3 dias ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni).

5. Teores de ácido ascórbico

Na medula espinal, o teor do ácido ascórbico reduziu significativamente nos animais do grupo com lesão no nervo isquiático, ou seja, no grupo CI aos 3 dias após a intervenção cirúrgica (Figura 12 A), quando estes valores foram comparados àqueles obtidos nos grupos controle e *Sham*. Aos 10 dias, esta redução não estava presente no grupo CI, e os valores encontrados na medula espinal destes animais foram similares àqueles obtidos na medula espinal dos animais dos grupos controle e *Sham* 3 ou 10 dias. Nenhuma modificação estatisticamente significativa ocorreu nos ratos pertencentes ao grupo *Sham* nos períodos de 3 ou 10 dias após a manipulação do nervo isquiático (Fig. 12A).

No tronco encefálico (Fig 12B) e no neocórtex (Fig. 12C) não foram observadas mudanças significativas nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 3 ou 10 dias após a intervenção cirúrgica periférica.

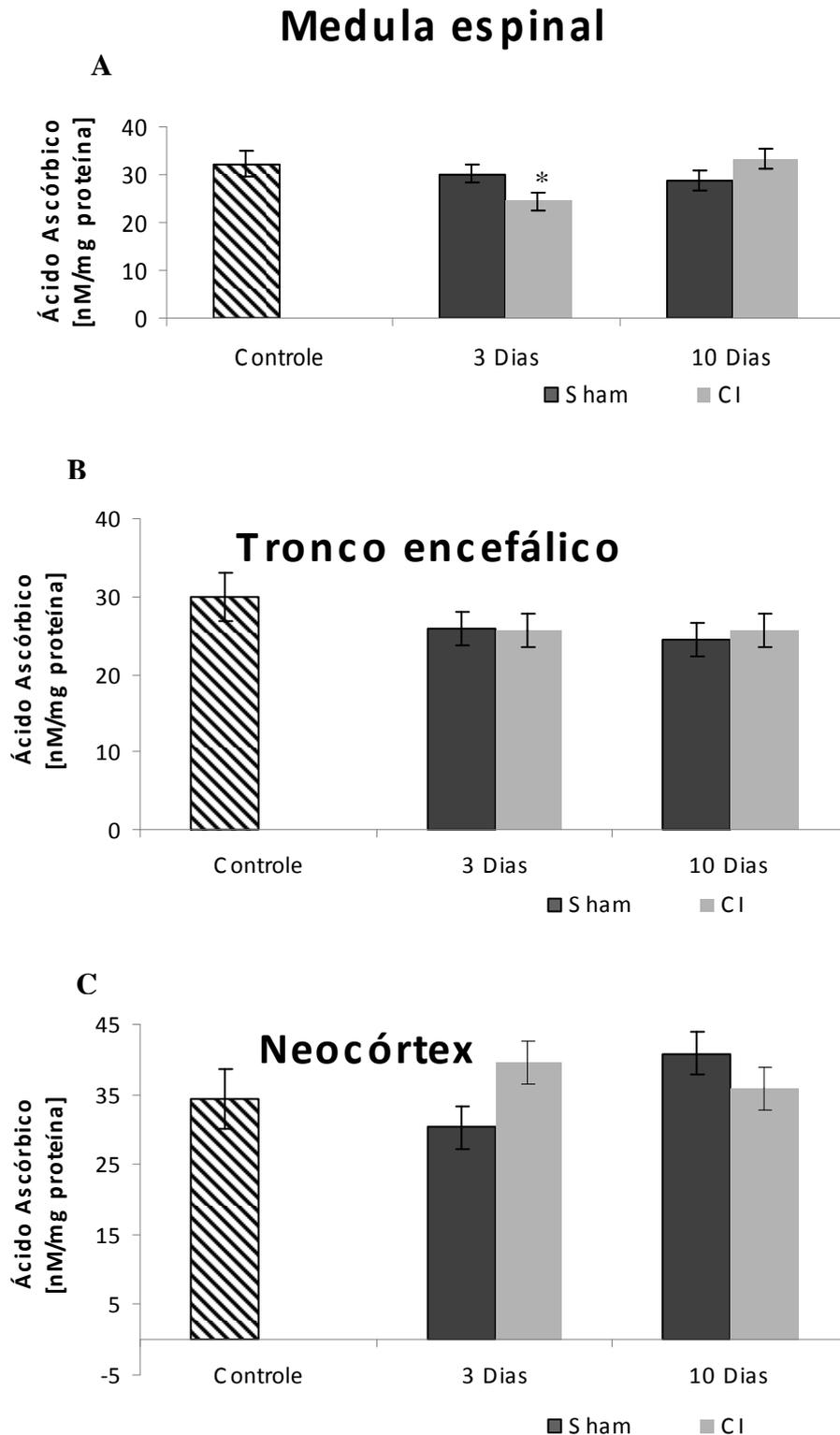


Figura 12 - Teores de ácido ascórbico em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) após 3 ou 10 dias da lesão. Os resultados estão expressos em média±erro padrão da média, n=6. * Indica diferença significativa quando comparado aos grupos controle e Sham dos 3 dias ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni).

6. Valores de peroxidação lipídica pela técnica do xilenol laranja

Na medula espinal, a constrição do nervo isquiático ocasionou aumento estatisticamente significativo na peroxidação de lipídeos medida pela técnica do xilenol laranja (Figura 13A). Este acréscimo ocorreu aos 3 e 10 dias após a injúria nervosa periférica, sendo o valor obtido aos 10 dias similar àquele dos 3 dias. Este valor foi significativamente diferente daqueles obtidos nos grupos controle e *Sham* dos 3 dias. Nos ratos do grupo *Sham*, o aumento significativo foi observado somente aos 10 dias após a lesão tecidual, sendo que este diferiu tanto dos valores do grupo *Sham* aos 3 dias como daqueles do grupo controle (Figura 13A).

No tronco encefálico houve aumento estatisticamente significativo nos valores de peroxidação lipídica apenas aos 10 dias (Figura 13B). Este acréscimo ocorreu tanto no grupo *Sham* como no grupo CI quando os valores dos mesmos foram comparados àqueles do grupo controle. Nos animais do grupo CI, o aumento ocorrido aos 10 dias foi estatisticamente diferente daquele do grupo CI dos 3 dias. No grupo *Sham* dos 10 dias o acréscimo foi significativamente diferente dos valores dos grupos *Sham* e CI dos 3 dias. É interessante destacar que o acréscimo da lipoperoxidação no tronco encefálico dos animais do grupo *Sham* foi o triplo daquela obtida nos ratos dos grupos CI dos 3 ou 10 dias, do *Sham* 3 dias e do controle (Figura 13B).

No neocórtex, os valores de peroxidação de lipídeos aumentaram somente aos 10 dias após a lesão periférica, estando este acréscimo significativo presente tanto no grupo CI como no grupo *Sham* deste período (Figura 13C). O aumento observado no neocórtex destes grupos experimentais diferiu significativamente dos valores obtidos nos grupos *Sham* e CI dos 3 dias, e controle.

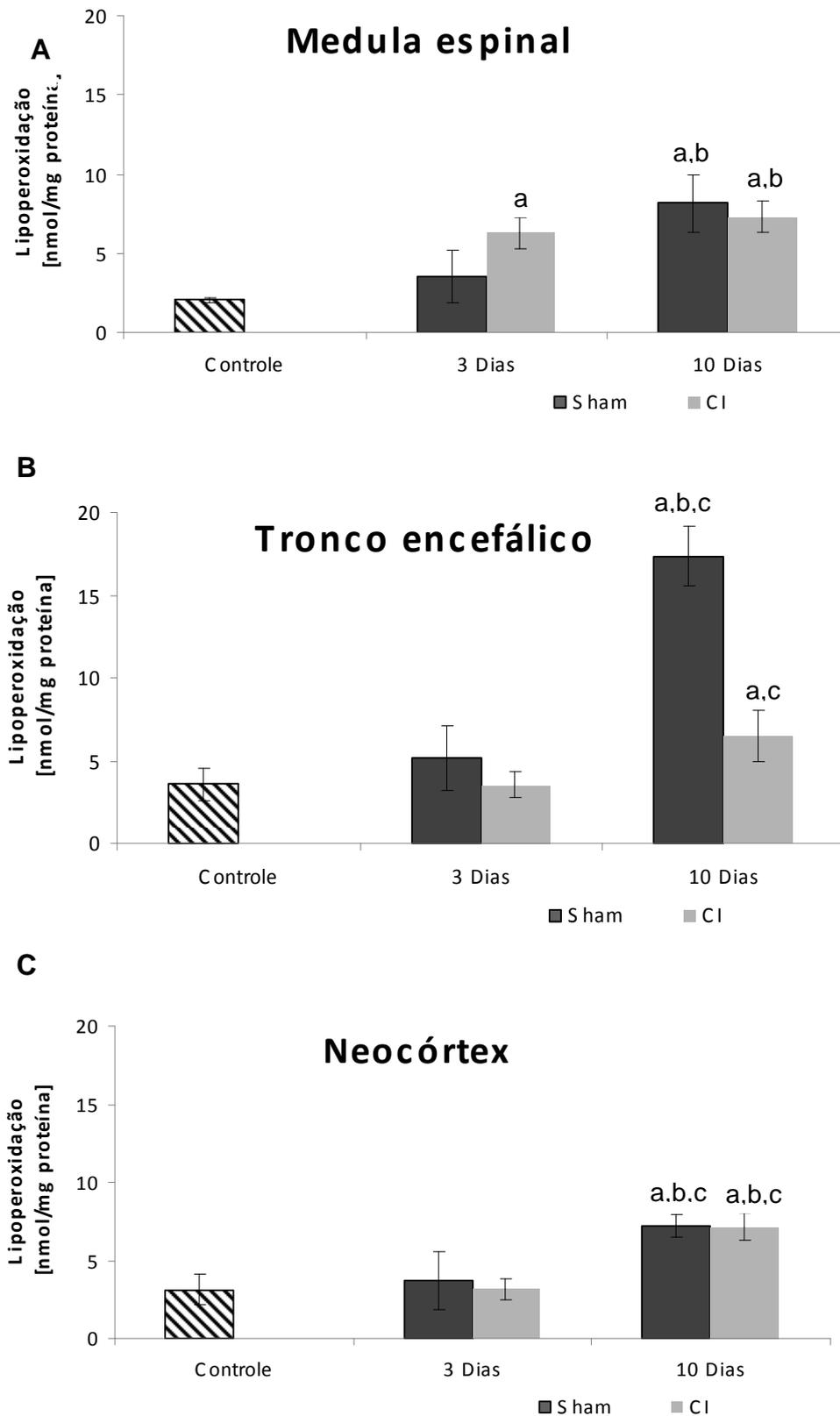


Figura 13 – Medida de lipoperoxidação por método do Xilenol Laranja em medula espinal (A), tronco encefálico (B) e neocórtex (C) de ratos controle e submetidos à manipulação (*Sham*) ou constrição do nervo isquiático (CI) após 3 ou 10 dias da lesão. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média, n=6. (a) Indica diferença significativa quando comparado ao controle; (b) indica diferença significativa quando comparado ao *Sham* dos 3 dias; (c) indica diferença significativa quando comparado ao CI dos 3 dias ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos alterações nas sensibilidades mecânica e térmica após indução de lesão nervosa periférica por constrição no nervo isquiático de ratos. Essas alterações foram similares às descritas na literatura (Khodr e Khalil, 2001; Cizcova et al, 2002; Varija, et al, 2009, Kim et al, 2004; Gabay, 2004).

Paralelamente às alterações nas sensibilidades mecânica e térmica, o presente estudo observou modificações na atividade de diversos parâmetros oxidativos na medula espinal lombossacral, tronco encefálico e neocórtex destes animais. Como as EROs parecem envolvidas no processamento da dor neuropática (Takahashi et al., 2007; Yowtak et al., 2011), as alterações dos parâmetros oxidativos observadas no presente estudo provavelmente se relacionam com as modificações na sensibilidade. Apesar da necessidade de realização de estudos complementares, é possível que as similaridades e diferenças ocorridas nos parâmetros oxidativos dos grupos *Sham* e CI estejam relacionadas com o nível de ativação das vias nociceptivas centrais nestas condições.

Na medula espinal lombossacral, região de entrada das informações sensoriais no modelo experimental utilizado em nosso estudo, a peroxidação de lipídios estava aumentada nos ratos do grupo CI aos 3 dias, estando ainda elevada aos 10 dias. O acréscimo de lipoperoxidação sugere aumento na produção de EROs nesses intervalos de tempo, neste grupo experimental, em decorrência da presença da lesão nervosa periférica, o que está de acordo com dados da literatura (Kato et al., 1996; Varija et al., 2009; Rossato et al., 2010; Yowtak et al., 2011). Como as sensibilidades mecânica e térmica estavam também aumentadas nestes períodos, isto sugere o envolvimento das EROs nestas sensações. Hipótese similar foi recentemente sugerida no estudo de Yowtak e colaboradores (2011), os quais observaram redução da hiperalgesia mecânica após administração intratecal de um *scavenger* de EROs. Interessantemente, a lipoperoxidação aumentou também na medula espinal do grupo *Sham* aos 10 dias após a lesão periférica, enquanto nenhuma modificação significativa ocorreu nas sensibilidades mecânica e térmica. Apesar de inicialmente este resultado permitir um questionamento da hipótese anteriormente sugerida, deve ser lembrado que este grupo de ratos foi submetido a uma lesão periférica para o isolamento do nervo isquiático. É possível que a lesão nesta situação não tenha sido suficiente para alterar as

sensibilidades, mas a ativação de nociceptores periféricos e a regeneração tecidual tenha ocasionado o aumento da lipoperoxidação na medula espinal destes animais. Um estudo recente realizado em nosso laboratório demonstrou, no grupo *Sham*, aumento estatisticamente significativo na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 dias após a realização da lesão tecidual (dados em redação). Este acréscimo pode ser o fator envolvido no aumento da lipoperoxidação neste grupo experimental.

Diferente da resposta do grupo *Sham*, o grupo CI reduziu significativamente a formação de H_2O_2 na medula espinal aos 10 dias após a lesão nervosa periférica. Contudo, esta diminuição já estava presente aos 3 dias após a intervenção cirúrgica (dados em redação). Considerando os resultados do presente estudo, onde se observou aumento na atividade da enzima CAT na medula espinal, aos 3 e 10 dias após a constrição do nervo isquiático, ou seja, apenas no grupo CI, se pode sugerir que a redução do H_2O_2 se relaciona com este aumento da atividade desta enzima. É sabido que a CAT neutraliza o peróxido de hidrogênio, resultando de sua atuação água e oxigênio (Mruk et al., 2002; Nishikawa et al, 2009).

Outra modificação que deve contribuir para os menores valores de H_2O_2 é a redução da atividade da enzima SOD na medula espinal aos 3 dias após a lesão periférica. Contudo, este decréscimo ocorreu tanto nos ratos do grupo CI como nos animais pertencentes ao grupo *Sham*. O retorno de sua atividade a valores similares àqueles encontrados no grupo controle ocorreu aos 10 dias, em ambos os grupos experimentais. É provável que esta diminuição na atividade da SOD seja uma consequência do aumento na formação de óxido nítrico. Hipótese similar foi recentemente sugerida diante da redução da atividade da SOD em córtex somatossensorial após indução de dor visceral (Vaculin et al., 2010). Está demonstrado que uma das modificações observadas após constrição no nervo isquiático é o acréscimo na formação de óxido nítrico (Joe e Lokesh, 1997; Khalil e Khodr, 2001; Naik et al., 2006). Como aos 3 dias há uma lesão periférica tanto nos ratos *Sham* como nos CI, isto provavelmente ocasionou aumento na síntese de óxido nítrico, o qual pode estar envolvido na redução da atividade da enzima SOD na medula espinal dos ratos destes grupos experimentais. Como a atividade desta enzima apresentou valor similar ao do grupo controle aos 10 dias, a formação de H_2O_2 aumentou nos grupos CI e *Sham*. Porém, apenas o grupo CI teve acréscimo na atividade da CAT neste período, o que ocasionou o decréscimo do H_2O_2 neste grupo. Como a transmissão sináptica parece ser reduzida diante de acréscimo no H_2O_2 (Geniatullin et al., 2006), o

decréscimo na formação desta molécula no grupo CI poderia estar contribuindo para a transmissão da informação nociceptiva neste grupo experimental, o único com aumento das sensibilidades mecânica e térmica neste estudo. Um apoio a esta hipótese é o estudo onde a administração de um inibidor da SOD reduziu o comportamento nociceptivo dos animais tratados (Viggiano et al., 2005).

Estudos sugerem que a defesa primária contra radicais sulfidril, de oxigênio e de nitrogênio no sistema nervoso central é o antioxidante não enzimático ácido ascórbico, sendo este rapidamente reduzido em situações de trauma a este tecido (Bayir et al., 2002; 2005; Tyurin et al., 2000). A depleção deste antioxidante promove aumento da concentração de radicais S-nitrosotíóis em fluidos biológicos (Bayir et al., 2005), os quais promovem nitrosilação em receptor de glutamato do tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato), reduzindo a excitotoxicidade deste neurotransmissor, e em caspases, o que diminui a apoptose (Lipton et al., 1993; Mannick et al., 1999). No presente estudo, houve redução do teor de ácido ascórbico na medula espinal dos ratos do grupo CI aos 3 dias após a injúria nervosa periférica. É possível que esta redução se relacione a este papel atribuído ao ácido ascórbico, pois a diminuição desta molécula, nesta situação experimental que sabidamente ativa mecanismos nociceptivos, contribuiria para o controle da ativação do receptor NMDA. É sabido que em situações de dor há aumento na liberação de glutamato e ativação do receptor NMDA (Millan, 1999). Frente ao provável aumento na liberação de glutamato na medula espinal dos animais do presente estudo, deve ser considerada ainda a hipótese de que a redução do ácido ascórbico se relacione com a maior ativação do trocador glutamato-ascorbato. Em situações de injúria por constrição na medula espinal houve aumento na concentração extracelular de ácido ascórbico, a qual parece ter decorrido do acréscimo na liberação de glutamato (Tsai et al., 2005). Esses autores propuseram que a ativação do trocador glutamato-ascorbato, nessa situação, ocorreu com o intuito de diminuir a excitotoxicidade provocada pela presença de glutamato no espaço extracelular. Esta possibilidade também deve ser considerada diante da redução do teor de ácido ascórbico na medula espinal dos ratos lesionados. Contudo, o teor desta molécula retornou a valores similares aos obtidos no grupo controle aos 10 dias. Está demonstrado que o ácido ascórbico não é sintetizado no sistema nervoso central de mamíferos, e em condições normais seus valores são precisamente regulados e mantidos com uma taxa de renovação de 2% h (Chatterjee et al., 1975; Spector et al., 1977). Isto pode ser a explicação para o retorno destes valores aos 10 dias.

Diferente das mudanças ocorridas na medula espinal, o tronco encefálico aumentou a lipoperoxidação apenas aos 10 dias nos grupos *Sham* e CI, o que indica acréscimo nas EROs neste período, nesses grupos experimentais. É possível que o aumento da atividade da enzima CAT nessa região encefálica no grupo CI, aos 10 dias, seja devido a este acréscimo da lipoperoxidação. O aumento na atividade desta enzima, por sua vez, provavelmente se relaciona com as mudanças na atividade da SOD. Esta enzima teve sua atividade reduzida aos 3 dias após a constrição do nervo isquiático e retornou a valores similares ao do grupo controle aos 10 dias. Similar à hipótese apresentada para a medula espinal, é possível que esta redução da SOD no grupo CI esteja contribuindo para a resposta comportamental nociceptiva deste grupo experimental (Viggiano et al., 2005; Takahashi et al., 2007). É possível que a diminuição da atividade desta enzima seja decorrente do aumento na formação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, os quais inibem sua atividade (Bray e Cockle, 1974; Joe e Lokesh, 1997). Pode-se sugerir aumento na formação destas moléculas desde que foi demonstrado que uma das consequências da constrição do nervo isquiático é o aumento na atividade neural de distintas áreas do tronco encefálico (Mao et al., 1993; Mor et al., 2011).

O maior valor de lipoperoxidação obtido no tronco encefálico dos animais do grupo *Sham* aos 10 dias deve se relacionar ao fato de que a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT estava reduzida neste período de tempo. Estando reduzida a atividade da SOD pode ter ocorrido aumento na formação do íon superóxido. SOD e CAT atuam sinergisticamente, de modo que a ausência ou menor atividade de uma resulta em menor efetividade na atividade da outra (Kono e Fridovich, 1982). O ânion superóxido, quando não neutralizado pela SOD, tem ação inibitória sobre a atividade da CAT, formando rapidamente um complexo reversível com o grupamento heme, junto ao Fe^{+3} . Como a primeira reação da CAT é justamente reduzir uma molécula de peróxido utilizando o elétron do ferro, para formar Fe^{+2} , a reação não ocorre (Putnam et al, 2000; Kono e Fridovich, 1982). Tal processo poderia estar envolvido na redução da atividade da CAT aos 10 dias. Se esta for a situação, parece que a lesão tecidual e a injúria nervosa periférica, nesta região do SNC, recrutam diferentemente os sistemas antioxidantes. Considerando as alterações de sensibilidade, pode-se sugerir que as mudanças oxidativas possivelmente estejam relacionadas com as diferentes intensidades nociceptivas dos grupos *Sham* e CI. Porém, o entendimento desta questão necessita da realização de estudos complementares com diferentes

abordagens metodológicas, as quais possibilitem a visualização de mudanças locais nesta região do tecido nervoso.

No neocórtex, a atividade da enzima SOD estava aumentada no grupo CI aos 3 e 10 dias após a intervenção cirúrgica, enquanto a atividade da CAT mostrou acréscimo somente aos 10 dias neste grupo experimental. Este resultado é o oposto daquele observado em dor visceral, pois neste tipo de dor houve redução da atividade das enzimas SOD e glutatona peroxidase no córtex somatossensorial dos animais algésicos (Vacullin et al., 2010). Porém, esta diferença deve ser analisada com cautela, pois o presente estudo mediu a atividade das enzimas SOD e CAT utilizando todo o neocórtex, o que impossibilita a visualização de resposta localizada. Assim, não se pode excluir a possibilidade de diminuição da atividade de enzimas antioxidantes no córtex somatossensorial dos ratos do grupo CI. Todavia, está demonstrado aumento da atividade neural em diversas áreas corticais de ratos submetidos à constrição do nervo isquiático (Mao et al., 1993). Atividade neural aumentada ocasiona maior utilização de oxigênio, o que leva à maior formação de EROs e, conseqüentemente, maior recrutamento de defesas antioxidantes, o que poderia explicar a maior atividade das enzimas SOD e CAT no grupo CI. Contudo, a atividade da enzima SOD aumentou no neocórtex dos ratos do grupo Sham aos 10 dias, enquanto nenhuma mudança significativa ocorreu na atividade da CAT nesta região do SNC. Estando a SOD com atividade aumentada, ocorreu maior formação de H_2O_2 , o que explica os maiores valores de lipoperoxidação no neocórtex dos animais deste grupo experimental. A falta de modificação na atividade da CAT possivelmente seja decorrente de uma maior utilização da enzima glutatona peroxidase nesta região. No cérebro de ratos, diversos trabalhos atribuem à glutatona peroxidase papel primário na eliminação de peróxidos (Dringen *et al*, 2000; Ishibashi et al, 2002). Em mamíferos, esta enzima é encontrada tanto no citosol como na matriz mitocondrial e é capaz de eliminar o peróxido de hidrogênio mais eficientemente do que a catalase (Ishibashi *et al*, 2002). (

Nenhuma modificação significativa ocorreu nos teores de ácido ascórbico do tronco encefálico e do neocórtex dos diferentes grupos experimentais. Sendo o ácido ascórbico a defesa primária contra radicais sulfidril de oxigênio e de nitrogênio no sistema nervoso central, o qual é rapidamente reduzido em situações de lesão a este tecido (Bayir et al., 2002; 2005; Tyurin et al., 2000), a falta de mudanças em sua concentração provavelmente está indicando a ausência de dano oxidativo nestas regiões. Todavia, esta hipótese deve ser também analisada com cautela, pois o

presente estudo determinou os teores desta molécula em homogeneizados de toda a região do tronco encefálico e neocórtex, o que impossibilitou a visualização de alterações locais nestes tecidos. Assim, para um melhor entendimento das mudanças nos teores de ácido ascórbico do tronco encefálico e neocórtex de ratos submetidos à lesão periférica é necessária a realização de estudos complementares que possibilitem a visualização de mudanças locais nestas regiões do tecido nervoso.

Embora o presente estudo tenha até este momento considerado as mudanças dos parâmetros oxidativos estudados como mecanismos para a proteção do tecido neural frente à presença de uma lesão periférica, não se pode descartar a possibilidade de que as modificações ocorridas não se relacionem a danos a lipídeos e proteínas. EROs podem agir como segundos mensageiros intracelulares que modulam sistemas de neurotransmissores envolvidos no processamento nociceptivo (Rhee et al., 2000). Este possível papel para as EROs poderia ter ocasionado as mudanças dos parâmetros oxidativos do SNC descritas no presente estudo. Ainda, deve ser considerada a possibilidade de que as modificações ocorridas no tronco encefálico e neocórtex, embora tenham sido observadas nos grupos lesionados, podem não estar diretamente envolvidas no processamento nociceptivo, mas relacionadas com atividade motora, ingestão alimentar, função cardiovascular e respiratória dos animais submetidos à lesão.

Assim, a realização de estudos complementares, com diferentes abordagens metodológicas que propiciem análise local das mudanças oxidativas, se torna necessário, e o conhecimento proporcionado pelos mesmos fornecerão subsídios para melhor entendimento das diferenças dos parâmetros oxidativos nos grupos *Sham* e CI mostrados no presente estudo.

Conclusão

A partir dos resultados do presente trabalho pode-se concluir que a constrição do nervo isquiático, como modelo de dor neuropática, desencadeia aumento nas sensibilidades mecânica e térmica e, paralelamente, aumento na lipoperoxidação e alterações em sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na medula espinal, tronco encefálico e neocórtex, tanto de ratos com constrição no nervo isquiático como em ratos *Sham*. Muitas dessas mudanças já estão presentes aos 3 dias após a intervenção cirúrgica, sendo ainda muitas delas observadas aos 10 dias após este procedimento. Embora seja possível que as modificações ocorram com o intuito de prevenir o estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo no SNC, devido à diferente intensidade de ativação das vias nociceptivas centrais nos ratos *Sham* e CI, é preciso considerar ainda a possibilidade de que as mudanças tenham ocorrido devido à utilização de EROs como sistemas de sinalização intracelular. Assim, a determinação de mudanças locais em parâmetros oxidativos nas regiões do SNC destes grupos experimentais poderá complementar o entendimento das mudanças de parâmetros oxidativos aqui observadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 125:121-126
- Amir R, Devor M. (1996). Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 16: 4733-4741.
- Apkarian, AV; Lavarello, S; Randolph, A; Berra, HH; Chialvo, DR; Besedovsky, HO; del Rey, A. (2006). Expresión of the IL-1 beta in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 407: 176-181.
- Baud, O.; Greene, A. E.; Li, J.; Wang, H.; Volpe, J. J.; Rosenberg, P. A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The J. of Neurosc.*, 24 (7), 1531-1540.
- Bayir H; Kagan, VE;; Borisenko,GG; Tiurina YY; Janesko, KL; Vagni VA; Biliar, TR; Williams, DL; Kochanek,PM. (2005) Enhanced oxidative stress in iNOS deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25(6):673-84.
- Bayir,H; Kagan, VE; Tiurina, YY; Tiurin ,V.; Rupel, RA; Adelson, PD; Graham, SH; Janesko, K; Clark, RS; Kochanek, PM. (2002). Assessment of antioxidant reserve and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pedriatr Res* 51(5) 571-8
- Bennett, G.J.; Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33: 87-107.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Murillo-Bonilla L, Rios C. (2003). Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochem. Res.* 28: 699-703.
- Boveris, A., Chance, B. (1973).The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- Bray RC e Cockle SA (1974) Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 139(1) 43-8
- Brooks, J.; Tracey, I. (2005). From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J. Anat.*, 207, 19-33.
- Campbell, W. W. (2009). Evaluation of peripheral nerve injury. *Eur. J. Pain Sup.*, 3, 37-40.
- Carvalho, WA.; Lemonica, L. (1998). Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. *Rev. Bras. Anestesiol.*, 48 (3), 221-241.
- Chatterjee IB; Gupta, SD; Majunder, AK; Nandi BK; Subramanian, M.(1975) Effect of ascorbic acid on histamine metabolism in scorbutic guinea-pigs. *J.Physiol* 251(2):271-9.
- Cizcova, D; Lukáková, N; Marsala, M; Marsala, J.(2002) Neurophatic pain is associated with alterations of nitric oxide syntase imunoreactivity and catalytic activity in dorsal root ganglia and spinal dorsal horn. *Brain Research Bulletin*, 58(2): 161–171.
- Costigan M; Scholz, J; Woolf, CJ. (2009). Neurophatic pain: a maladaptative response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 32: 1–32.
- Costigan, M.; Scholz, J.; Samad, T.; Woolf, C. J. (2006). Pain. In: Siegel, G. J.; Albers, R. W.; Brady, S. T.; Price, D. L (eds). *Basic Neurochemistry*, Academic Press, 7^a ed., 928-937.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth.* 101(1):8-16. Epub 2008 Apr 15. Review.
- Dringen R; Gutterer JM; Hirrlinger J. (2000).Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.*267(16):4912-6

- Dubner, R. (1983). Pain research in animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 75: 128-132.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247.
- Fridovich I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 201(8):1203-9. Review.
- Gabay, E.; Tal, M. (2004). Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 110:354-360
- Gardiner J, Barton D, Overall R and Marc J.(2009) Neurotrophic support and oxidative stress: converging effects in the normal and diseased nervous system. *Neuroscientist* 15:47-61.
- Gazda SL; Milligan, ED; Hansen, MK; Twining, CM; Poulos, NM; Chacur, M; O'Connor, KA; Armstrong, C; Maier, SF; Watkins, LR; Myers, RR. (2001) Sciatic inflammatory neuritis (SIN) behavioral allodynia is paralleled by peri sciatic proinflammatory cytokine and superoxide production. *Journal of the peripheral nervous system* 6:111-129.
- Geniatullin, AR., Darios, F., Shakirzyanova, A., Davletov, B., Geniatullin, R. (2006). SNAP-25 is a pre-synaptic target for the depressant action of reactive oxygen species on transmitter release. *J. Neurochem* 98(6): 1789-1797.
- Guedes RP, Dal Bosco L, Teixeira CM, Araújo ASR, Llesuy S, Belló-Klein A, Ribeiro MFM, Partata WA. (2006). Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity in Rat Spinal Cord. *Neurochem Res* 31: 603–609.
- Guedes RP, Araújo AS, Janner D, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA (2008) Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.* 28(8):1049-56. Epub 2008 Apr 1.
- Guedes RP, Dal Bosco L, Araújo AS, Belló-Klein A, Ribeiro MF, Partata WA (2009) Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 80(6):422-7. Epub 2009 Aug 14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. 3th edition. *Oxford University Press*.
- Hayashi M, (2009). Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology.* 29, 1-8.
- Huang ZJ, Song XJ.(2008). Differing alterations of sodium currents in small dorsal root ganglion compression and peripheral nerve injury. *Molec Pain.* 4: 20.
- IASP - INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN.(2008) Subcommittee on taxonomy. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Pain, Suppl.* 3: S1-S226. 1986.
- Ishibashi, N; Prokopenko O; Weisbrot-Lefkowitz M; Reuhl KR; Mirochnitchenko O. (2002).Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. *Brain Res Mol* 109 (1-2):34-44
- Jiang ZY; Woollard AC; Wolff SP.(1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26(10):853-6
- Joe e Lokesh (1997). Studies on the inactivation of superoxide dismutase activity by nitric oxide from rat peritoneal macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry* 168: 87–93,
- Juhl GI, Jensen TS, Norholt SE, Svensson P.(2008). Central sensitization phenomena after third molar surgery:a quantitative sensory testing study. *Eur. J. Pain* 12:116–27
- Katoh S. Mitsui Y; Kitani K; Suzuki T. (1996) Nerve growth factor rescues PC12 cells from apoptosis by increasing amount of bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 229(2):653-7.

- Kavaliers, M. (1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.* 21: 923-931.
- Khalil Z; Sanderson K; Modig M; Nyberg F.(1999). Modulation of peripheral inflammation by locally administered endomorphin-1. *Inflamm Res*,48(10)550-6
- Khodr B, Khalil Z. (2001). Modulation of inflammation by reactive oxygen species implications for aging and tissue repair. *Free Rad. Biol. Med.* 30: 1-8.
- Kim HK, Park SK; Zhou JL; Tagliatela G; Chung K; Koggeshall RE; Chung JM. (2004) Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111:116–24.
- Klusáková, I; Dubový, P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – An anatomical perspective. *Ann. Anat*, 191, 248-259.
- Kono Y; Fridovich I. (1982) Superoxide radicals inhibits catalase.. *J. Biol Chem.*257(10):5751-4.
- Lekan HÁ, Carlton SM, Coggeshall RE. (1996). Sprouting of B-HRP fixed fibers of the L5 spinal nerve following L5 and L6 spinal ligation in the rat. *Neurosci. Lett.* 208: 147-150.
- Lerouet D, Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margail I. (2002). Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 958: 166-75.
- Levy D; Hoke A; Zochodne DW. (1999) Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neuroscience letter* 260:207-209.
- Lewén, A.; Matz, P.; Chan, PH. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J. of Neurot.*, 17 (10), 871-890.
- Lipton SA; Choi YB; Pan ZH; Lei SZ; Chen HS; Sucher NJ; Loscalzo J; Singel DJ; Stamler JS. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364(6438):626-32
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71(3):241-9.
- Loeser, JD. Bonica, JJ. (2001). History's of pain concepts and therapies. In: Loeser, J. D.; Butler, S. H.; Chapman, R.; Turk, D. C. (eds). *Bonica's management of pain*. Lippincott Williams & Wilkins, 3-25.
- Lowry OH; Rosebrough, NJ; Farr AL; Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265.
- Ma W, Bisby MA (1998) Partial and complete sciatic nerve injuries induce similar increases of neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide immunoreactivities in primary sensory neurons and their central projections. *Neurosci.* 86: 1217-1234.
- Mannick JB; Hausladen A; Liu L; Hess, DT; Zeng M; Miao QX; Kane LS; Gow AJ; Stamler JS. (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284(5414):651-4.
- Mao J; Mayer DJ; Price DD. (1993) Patterns of increased brain activity indicative of pain in a rat model of peripheral mononeuropathy. *The Journal of Neuroscience.* 13(6) 2689-2702
- Marklund, S.(1995) In: Handboock of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton. CRC Press. Pp. 243-247.
- Mason, MR; Lieberman, AR; Grenningloh, G; Anderson, PN. (2002). Transcriptional upregulation of SCG10 and CAP-23 is correlated with regeneration of the axons of peripheral and central neurons in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 20: 595-615.
- McMahon M; Thomas N; Itoh K; Yamamoto M; Haves JD. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a

- "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem.* 25;281(34):24756-68.
- McMahon, S. B., Koltzenburg, M. (2006). Wall and Melzack's Textbook of Pain. 5^a ed., Elsevier,
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, v. 57, p. 1-164.
- Mor, D., Bembrick, A. L., Austin, P. J., Keay, K. A. (2011). Evidence for cellular injury in the midbrain of rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J. Chem. Neuroanat.* 41: 158-169.
- Mosley RL et al. (2006). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci Res.* 6(5): 261-281.
- Mruk, D. D.; Silvestrini, B.; Mo, M.; Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis and role in the male fertility. *Contraception*, 65, 305-311.
- Muthuraman, A.; Jaggi, AS; Singh, N; Singh, D. (2008). Ameliorative effects of amiloride and prolidoxine in chronic constriction injury and vincristin-induced painful neuropathy in rats. *Eur J Pharmacol.* 587: 104-111.
- Naik, AK; Tandan, SK; Dudhgaonkar, SP; Jadhav, SH; Kataria, M; Prakash, VR; Kuman, D.(2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain.* 10: 573-579.
- Navarro, X; Vivó, M; Valero-Cabré, A. (2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol.* 82: 163-201.
- Nishikawa, M.; Haschida, M.; Takakura, Y. (2009). Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61 (4), 319-326.
- Oliveira, L. M.; Silva, L. F. S. (2009). Mecanismos neurais e modulação da dor. In: Neto, O. A. et al (org). *Dor, princípios e prática, Artmed*, 235-246.
- Pasero, C. (2004). Pathophysiology of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*, 5 (1), 3-8.
- Patra, R.C.; Swarup, D.; Dwivedi, S. K. (2001). Antioxidant effects of alfa-tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain rats. *Toxicol.*, 162, 81-88.
- Putnam CD; Arvai AS; Bourne Y; Tainer JA. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 296 (1)295-309
- Radi R; Beckman JS; Bush KM; Freeman BA. (1991) Peroxynitrite- induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Bioph* 288:481-487.
- Rhee SG; Bae YS; Lee SR; Kwon J.(2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates proteinphosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000(53):pe1.
- Ribeiro SMR, Queiroz JH, Pelúzio MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR (2005) A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal* 21(3):133-149. Versão online.
- Rice ME (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23(5):209-16. Review.
- Robinson, L. R. (2000). Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle Nerve*, 23 (6), 863-873.
- Roe JK; Kuether CA.(1942) A color reaction for dehydroascorbic acid is useful in the determination of vitamin C. *Science.* 95 (2455):77.
- Romero (1996). Antioxidants in peripheral nerve. *Free Rad Biol Med* 20:589-599.

- Rossato MF; Velloso NA; de Oliveira Ferreira AP; de Mello CF; Ferreira J. (2010). Spinal levels of nonprotein thiols are related to nociception in mice. *J. Pain.* 11 (6) 545-554.
- Rydh-Rinder, M.; Holmberg, K.; Elfvin, L.G.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hökfelt, T. (1996). Effects of peripheral axotomy on neuropeptides and nitric oxide synthase in dorsal root ganglia and spinal cord of the guinea pig: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 707: 180-188.
- Saadé, NE; AlMin,H; Abdel Baki, S; Chalouhi, S; Jabbur, SJ; Atweh, SF. (2007). Reversible attenuation of neuropathic-like manifestations in rats by lesions or local block of the intralaminar or the medial thalamic nuclei. *Exp Neurol.* 204:205-219.
- Schaible, H-G; Richter, F.(2004). Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* 389: 237-243.
- Siniscalco D; Fuccio C; Giordano C; Ferraraccio F; Palazzo E; Luongo L; Rossi F; Roth KA; Maione S; de Novellis V..(2007). Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. *Pharmacological research.* 55, 158-166.
- Sneddon, LU.(2004). Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Rev.* 46(2):123-30.
- Södergren E; Nourooz-Zadeh J; Berglund L; Vessby B. (1998) Re-evaluation of the ferrous oxidation in xylene orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. *J Biochem Biophys Methods.* 37(3):137-46
- Sommer, C.; Myers, R.R.(1995). Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol.* 90: 478-485.
- Spector R; Levy P; Abelson HT. (1977). Identification of dihydrofolate reductase in rabbit brain. *Biochem. Pharmacol.* 26 (16)1507-11
- Stahl GL; Pan HL; Longhurst JC. (1993) Activation of ischemia and reperfusion-sensitive abdominal visceral C fiber afferents. Role hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. *Circ Research* 72:1266-1275.
- Szabo, C. (1998). Role of poly(ADP-ribose)synthetase in inflammation. *Eur. J. Pharmac.* 350: 1-19.
- Takahashi M; Ko LW; Kulathingal J; Jiang P; Seviever D; Yen SH (2007) Oxidative stress-induced phosphorylation, degradation and aggregation of alpha-synuclein are linked to upregulated CK2 and cathepsin D. *Eur. J. Neurosci* 26 (4) 863-74
- Takeuchi Y; Takasu K; Honda M; Ono H; Tanabe M. (2007). Neurochemical evidence that supraspinally administered gabapentin activates the descending noradrenergic system after peripheral nerve injury. *European Journal of Pharmacology.* 556: 69-74.
- Tan EC; Bahami, S; Kozlov, AV; Kurvers, HA; Ter Laak, HJ; Nohl, H; Redl, H; Goris, RJ. (2009). The oxidative response in chronic constriction injury model of neuropathic pain. *J. of Surgical Res* 152:84-88.
- Teixeira, M. J. (2003). Fisiopatologia da dor neuropática. In: Teixeira, M. J. (ed). Dor – contexto interdisciplinar, *Editores Maio*, 155-169.
- Tracey, I. (2005). Nociceptive processing in the human brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 15, 478-487.
- Tsai CC; Chen HS; Chen SL; Ho YP; Ho KY; Wu YM; Hung CC. (2005) Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *J. Periodontal Res* 40 (5):378-84
- Tyurin VA; Tyurina YY; Borisenko GG; Sokolova TV; Ritov VB; Quinn PJ; Rose M; Kochanek P; Graham SH; Kagan VE. (2000) Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantification of biomarkers and detection of free radical intermediates. *J. Neurochem.* 75(5)2178-89

- Uçeyler, N; Tschärke, A; Sommer, C. (2008). Early cytokine gene expression in mouse CNS after peripheral nerve lesion. *Neurosci Lett.* 436: 259-264.
- Vaculin S; Franek M; Veirazka M. (2010) Role of oxidative stress in animal *Neuroscience letter* 477 (2) 82-85
- Varija D; Kumar KP; Reddy KP; Reddy VK.(2009) Prolonged constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors e antioxidant enzymes in rats. *Indian J Med Res* 129, May 2009, pp 587-592
- Viggiano A; Monda M; Viggiano A; Viggiano D; Viggiano E; Chiefari M; Aurilio C; De Luca B (2005). Trigeminal pain transmission requires reactive oxygen species production. *Brain Res.*1050(1-2)72-8
- Wagner, R; Heckman, HM; Myers, RR. (1998). Wallerian degeneration and hiperalgesia after peripheral nerve injury are glutathione-dependent. *Pain.* 77: 173-179.
- Webster, N.R., Nunn, J.F.(1988) Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth.* 60 (1):98-108.
- Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. (1993). Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br. Med. Bull.* 49: 506-522.
- Xie W; Matsumoto M; Chun J; Ueda H. (2008). Involvement of LPA receptor signaling in the organization of spinal input through Abeta-fibers in mice with partial sciatic nerve injury. *Molec Pain.* 4: 46-50
- Yowtak J; Lee KY; Kim HY; Wang J; Kim HK; Chung K; Chung JM (2011) Reactive oxygen species contribute to neurophatic pain by reducing spinal GABA release. *Pain* 152: 844–852
- Zangar, R. C.; Davydov, D. R.; Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied pharmacology*, 199, 316-331.
- Zhao, P; Waxman, SG; Hains, BC. (2004). Sodium channel expression in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus after peripheral nerve injury. *Mol Pain.* 2:27.
- Zimmermann, M. 2001. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol*, 429: 23-37.